



**Vanda Isabel Roldão  
Canelas Vaz Serra**

**Novos derivados porfirínicos: síntese e potenciais  
aplicações na detecção de neoplasias**



**Vanda Isabel Roldão  
Canelas Vaz Serra**

**Novos derivados porfirínicos: síntese e potenciais  
aplicações na detecção de neoplasias**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química de Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Aos meus pais e ao Paulo, por tudo.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva**

Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. José Abrunheiro da Silva Cavaleiro**

Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Alice Maria Esteves Dias**

Professora Auxiliar da Escola de Ciências da Universidade do Minho

**Prof. Dr. Maria do Amparo Ferreira Faustino**

Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Desejo expressar os mais sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho:

Aos meus orientadores: Professor Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, e Doutora Maria do Amparo Faustino, por me terem permitido a entrada no doce mundo da Química Orgânica e por todo o acompanhamento e conhecimento científico transmitido ao longo destes dois últimos anos.

À Professora Doutora Graça Neves para a qual não existem palavras que descrevam toda a dedicação, apoio, incentivo e amizade concedida. Muito obrigado por me ajudar a “crescer”.

Ao Professor Doutor Artur Silva pela sua constante disponibilidade, paciência e boa disposição, a qualquer hora do dia, na tão preciosa ajuda na interpretação os espectros de RMN.

À Doutora Diana Pinto, pela prontidão com que “me arranjava mais uma calconazita!”

À Doutora Rosarinho, pelo apoio e persistência na análise dos espectros de massa.

Ao Dr. Hilário Tavares e à Dr<sup>a</sup> Cristina Barros, técnicos responsáveis pela espectroscopia de RMN e espectrometria de massa, pela colaboração prestada.

À Sandra e à Fátima agradeço a estreita colaboração neste projecto, nomeadamente na realização dos estudos de avaliação biológica.

À Eduarda e à Mafalda, as minhas “companheiras de guerra”, pelas horas de estudo passadas, que marcaram o início de uma grande amizade. Nunca vos esquecerei.

À Joana e à Maria pela incansável amizade em todos os momentos difíceis.

Às restantes “pombas-brancas” do laboratório Francesca, Cristina, Guida e João Tomé e aos mais recentes “brasileirinhos” Anderson e Rodrigo, por tudo.

Aos meus pais e irmão por toda a confiança “Calma e cabecinha no lugar...”

Ao Paulo pelo carinho, confiança, apoio incondicional e paciência infinita.

À Universidade de Aveiro e ao Departamento de Química por me terem proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Ao projecto “CTS-17”, agradeço a bolsa de investigação científica concedida.

## palavras-chave

Porfirinas, flavonóides, aminoácidos, fotodiagnóstico, neoplasias.

## resumo

O trabalho descrito nesta dissertação envolveu a síntese, caracterização estrutural e avaliação biológica de novos macrociclos porfirínicos com potencial aplicação em fotodiagnóstico de neoplasias.

Na primeira parte da dissertação, são abordadas as reacções que envolvem a funcionalização de *meso*-tetra-arilporfirinas, nas posições *meso* e  $\beta$ -pirrólicas, com moléculas de flavonóides.

Alguns dos compostos sintetizados foram sujeitos a estudos de fotoestabilidade e avaliação biológica, nomeadamente citotoxicidade, localização e acumulação celular. Os resultados obtidos mostram que estes derivados além de fotoestáveis e fluorescentes apresentam acumulação celular e não são citotóxicos, e por isso poderão ser moléculas promissoras no fotodiagnóstico/diagnóstico de tecidos neoplásicos.

Na segunda parte desta dissertação é descrita a síntese de novos derivados porfirínicos acoplados a aminoácidos.

A estrutura dos compostos sintetizados foi estabelecida com recurso a técnicas espectroscópicas actuais nomeadamente ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$  e UV-Vis. Os conjugados de tipo porfirina-aminoácido foram também caracterizados por espectrometria de massa em Electrospray.

**keywords**

Porphyrins, flavonoids, amino acids, photodiagnosis, neoplastic diseases.

**abstract**

The work reported in this thesis involves the synthesis, structural characterization and biological evaluation of new porphyrin derivatives with potential application in the diagnosis of neoplastic diseases. In the first part are mentioned reactions of functionalization of *meso*-tetraarylporphyrins, in *meso* and  $\beta$ -pyrrolic positions, with flavonoids. Studies of photobleaching and biological evaluation, namely cytotoxicity, cellular localization and cellular uptake were carried out with some of the synthesized compounds. The results show that these compounds are photostable, fluorescent and exhibit a reasonable uptake, so they can be promising molecules to be used in the photodiagnosis/diagnosis of neoplastic diseases. In the second part of this thesis is described the synthesis of new porphyrin-amino acid conjugates. The structural analysis of the synthesized compounds was made by using several spectroscopic techniques mainly nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , COSY, HSQC e HMBC), mass spectrometry and UV-Visible. The porphyrin-amino acid conjugates were also characterized by Electrospray Tandem Mass Spectrometry.

## Índice

<b>Capítulo I .....</b>	<b>5</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1- Macro ciclos tetrapirrólicos: considerações gerais .....</b>	<b>7</b>
1.2- Propriedades físico-químicas .....	8
1.3- Aplicações .....	11
1.4- Terapia Fotodinâmica e Fotodiagnóstico .....	15
1.4.1- Conceitos fotofísicos: nota introdutória .....	15
1.4.2- Princípios básicos de PDT e de FD .....	17
1.4.3- Principais características de um bom fotossensibilizador em PDT e FD .....	19
1.4.4- Incorporação e localização celulares .....	20
1.4.5- Fotodiagnóstico <i>via</i> ácido 5-aminolevulínico .....	23
1.4.5.1- Metabolismo do ALA .....	23
1.5- Referências .....	27
<b>Capítulo II .....</b>	<b>29</b>
<b>Síntese e avaliação biológica de porfirinas .....</b>	<b>29</b>
<b>acopladas a flavonóides .....</b>	<b>29</b>
2.1- Flavonóides: considerações gerais .....	31
2.2- Acoplamento de porfirinas a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona .....	37
2.2.1- Acoplamento da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona .....	37
2.2.1.1- Estudo das condições de acoplamento .....	38
2.2.2- Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20- tris(3-metoxifenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona .....	40
2.2.3 Caracterização estrutural dos derivados de tipo porfirina-calcona .....	43
2.2.3.1- Derivados <b>2</b> e <b>3</b> .....	43
2.2.3.2- Derivado <b>6</b> .....	49
2.3- Porphirinas como dipolarófilos em reacções de cicloadição 1,3-dipolar .....	50
2.3.1- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina <b>1</b> a derivados de <i>N</i> -flavonilglicina .....	53



2.3.1.1- Caracterização estrutural dos derivados de tipo porfirina-flavona.....	59
2.3.1.1.1- Caracterização por UV-Vis dos derivados <b>10</b> , <b>13</b> e <b>16</b> .....	59
2.3.1.1.2- Caracterização por RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{19}\text{F}$ das clorinas <b>10</b> , <b>13</b> e <b>16</b> .....	61
2.4- Actividade biológica .....	67
2.4.1- Estudos de fotoestabilidade .....	68
2.4.2- Estudos de viabilidade, morfologia e localização celulares .....	75
2.4.3- Determinação da quantidade de fotossensibilizador associado às células COS-7.....	79
2.4.4- Conclusão e discussão de resultados .....	81
2.5- Parte experimental da síntese .....	83
2.5.1- Reagentes, solventes e equipamento .....	83
2.5.2- Síntese das porfirinas <b>1</b> e <b>4</b> .....	85
2.5.3- Acoplamento de macrociclos porfirínicos a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona....	85
2.5.3.1- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado <b>2</b> .....	85
2.5.3.2- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado <b>3</b> .....	86
2.5.4- Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado <b>6</b> .....	87
2.5.4.1- Activação do grupo carboxilo com <i>N</i> -hidroxi-succinimida .....	87
2.5.4.2.- Acoplamento do éster activado <b>5</b> a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona .....	88
2.5.5- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a derivados de <i>N</i> -flavonilglicina.....	89
2.5.5.1- Procedimento geral.....	89
2.5.5.2- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a <i>N</i> -(4-flavonil)glicina <b>7</b> - síntese do derivado <b>10</b> .....	90
2.5.5.3- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a <i>N</i> -(3-flavonil)glicina <b>8</b> - síntese do derivado <b>13</b> .....	91
2.5.5.4- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a <i>N</i> -(4-flavonil)glicina <b>9</b> - síntese do derivado <b>16</b> .....	92
2.6- Referências .....	93
<b>Capítulo III .....</b>	<b>97</b>

<b>Síntese e caracterização por espectrometria de massa de porfirinas ligadas a aminoácidos .....</b>	<b>97</b>
3.1- Introdução .....	99
3.2- Síntese de porfirinas ligadas a aminoácidos.....	101
3.2.1- Estudo das condições de acoplamento: acoplamento de glicinato de metilo à porfirina <b>4</b> .....	101
3.2.2- Acoplamento de outros aminoácidos a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina .....	104
3.2.2.1- Acoplamento de glicina.....	104
3.2.2.2- Acoplamento de tirosina .....	105
3.2.2.4- Acoplamento de serinato de metilo.....	109
3.2.2.5- Acoplamento de metioninato de metilo .....	112
3.2.2.6- Acoplamento de cisteína .....	114
3.3- Caracterização por espectrometria de massa de derivados de porfirina acoplados a aminoácidos.....	115
3.3.1- Espectrometria de massa: considerações gerais .....	115
3.3.2- Ionização por Electrospray (ESI) .....	116
3.3.3- Quadrupolos .....	118
3.3.4- Analisadores de tempo de voo (TOF) .....	118
3.3.5- Espectrometria de massa Tandem (MS/MS).....	119
3.4- Caracterização por ESI-MS/MS dos derivados <b>17-23</b> .....	120
3.4.1- Resultados de ESI-MS e discussão .....	121
3.4.1.1- Fragmentação da porfirina <b>26</b> .....	121
3.4.1.2- Estudo das fragmentações dos conjugados de tipo porfirina-aminoácido <b>17-21</b> .....	122
3.4.1.2.3- Estudo das fragmentações dos derivados de tipo diporfirinilo <b>22</b> e <b>23</b> .....	133
3.5- Conclusão .....	142
3.6- Parte experimental.....	142
3.6.1- Reagentes, solventes e equipamento experimental .....	142
3.6.2- Síntese de porfirinas acopladas a aminoácidos-procedimento geral.....	143
3.6.2.1- Acoplamento de glicinato de metilo .....	144
3.6.2.2- Acoplamento de glicina.....	144

3.6.2.3- Acoplamento de tirosina .....	145
3.6.2.4- Acoplamento de serinato de metilo .....	146
3.6.2.5- Acoplamento de metioninato de metilo .....	147
3.6.2.6- Acoplamento de cisteína. ....	148
3.7- Referências .....	148

## **Capítulo I**

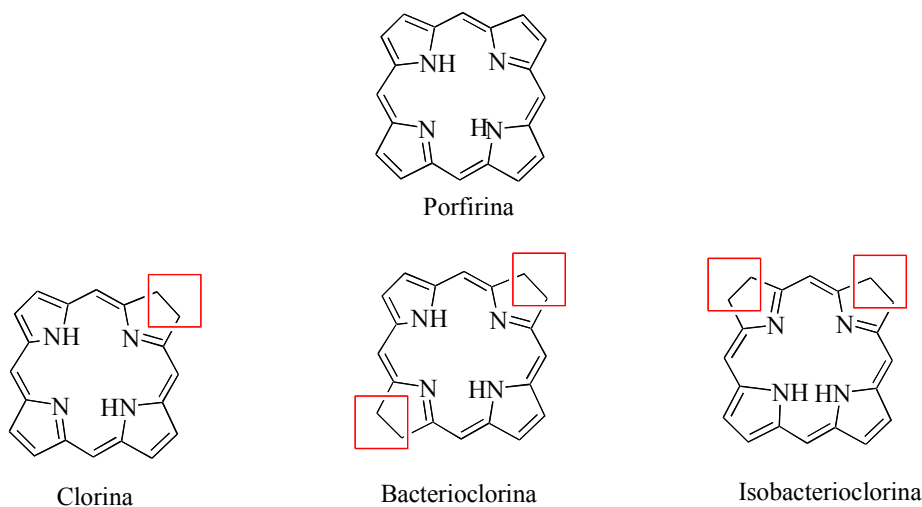
### **Introdução**



## 1.1- Macrociclos tetrapirrólicos: considerações gerais

Os macrociclos tetrapirrólicos, responsáveis por importantes funções biológicas como a respiração e a fotossíntese, englobam uma vasta gama de compostos constituídos por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por quatro pontes metínicas.

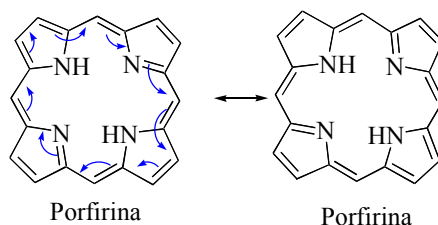
A designação das suas estruturas como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas encontra-se relacionada com o grau de insaturação dos anéis pirrólicos, assim como com a posição relativa dessa insaturação, caso exista (Esquema 1.1). No caso específico em que os anéis pirrólicos se apresentam totalmente insaturados, o macrociclo tetrapirrólico é denominado de porfirina. As clorinas são caracterizadas por apresentarem um dos anéis pirrólicos com dois centros  $sp^3$  e as bacterioclorinas assim como as isobacterioclorinas são definidas estruturalmente pela presença de dois anéis pirrólicos com dois centros  $sp^3$ . Nas bacterioclorinas estes centros apresentam-se em posições opostas; já nas isobacterioclorinas, estes encontram-se em posições adjacentes.



Esquema 1.1

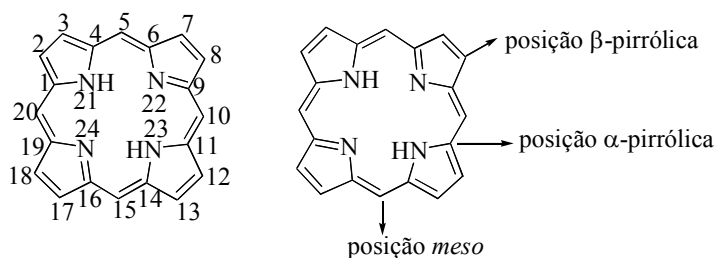
Relativamente à aromaticidade destes compostos tetrapirrólicos ainda há a referir que, apesar do diferente número de electrões  $\pi$  presentes, todos eles apresentam carácter aromático. As porfirinas, têm na sua estrutura vinte e dois electrões  $\pi$ . No entanto, essencialmente dezoito destes participam directamente na aromaticidade do macrociclo

(Esquema 1.2). Desta forma, também as clorinas, isobacterioclorinas e bacterioclorinas apresentam carácter aromático, de acordo com a regra de Huckel para a aromaticidade ( $4n+2$  electrões  $\pi$ ).<sup>1</sup>



Esquema 1.2

O sistema de numeração proposto pela IUPAC é apresentado no Esquema 1.3. Durante a realização deste trabalho e, sempre que possível, recorreu-se a este sistema de numeração na designação dos derivados apresentados. No entanto, recorre-se também de forma a facilitar a exposição, às designações de *meso* para denominar as posições 5, 10, 15 e 20 do sistema IUPAC e posições  $\beta$ -pirrólicas relativamente às posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 do macrociclo (Esquema 1.3).



Esquema 1.3

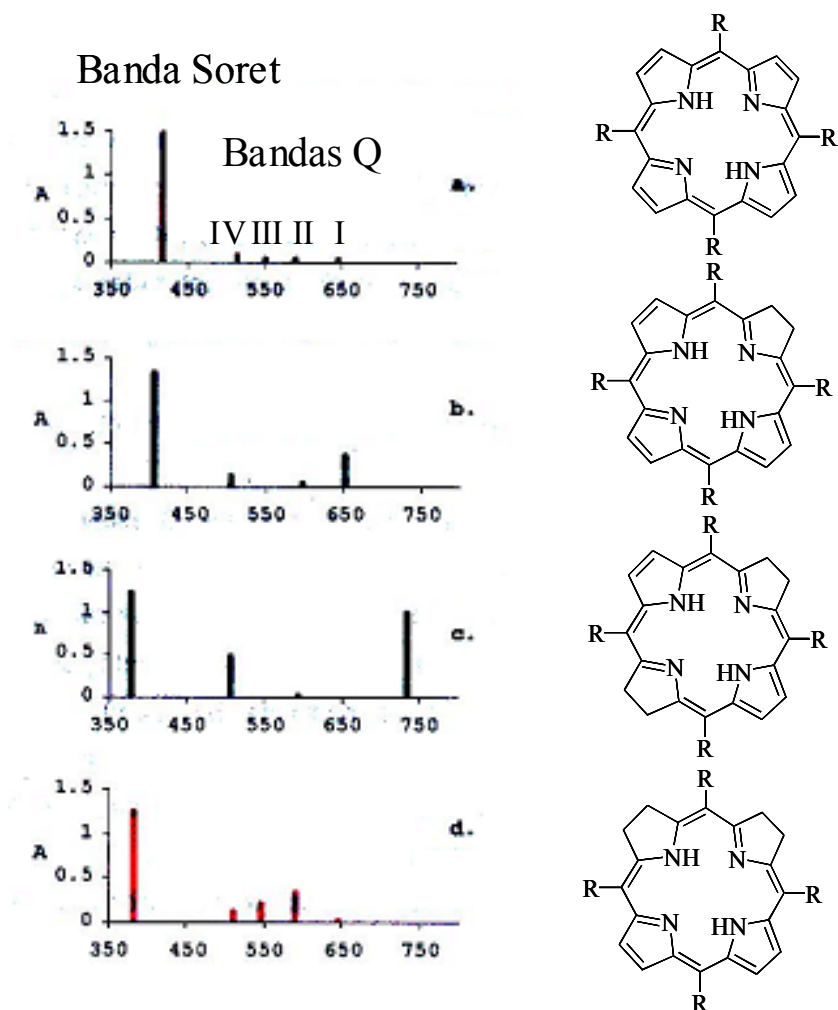
## 1.2- Propriedades físico-químicas

Os macrociclos tetrapirrólicos são compostos fortemente corados, apresentando portanto bandas típicas de absorção na zona do visível do espectro electromagnético.

São caracterizados pela presença de uma forte banda de absorção, na região dos 400 nm, designada por banda Soret, e por quatro bandas satélite menos intensas, na região dos 450-750 nm, designadas por bandas Q. A banda Soret reflecte a presença dos dezoito electrões  $\pi$  deslocalizados, responsáveis pelo carácter aromático deste tipo de compostos. Assim, é a banda de maior intensidade nos espectros de visível de compostos de tipo porfírina, clorina, bacterioclorina e isobacterioclorina.<sup>2</sup>

Os espectros de absorção dos derivados reduzidos, apresentam diferenças significativas face aos espectros de absorção das porfirinas, nomeadamente a nível da intensidade relativa das bandas Q (Esquema 1.4). Desta forma, a espectroscopia de UV-Vis é uma das técnicas habitualmente usadas na identificação destes compostos, permitindo distinguir claramente porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas. Nas clorinas, a banda QI, apresenta-se mais intensa do que a banda Q das porfirinas na mesma região dos 650 nm, enquanto que nas bacterioclorinas não só esta banda apresenta uma intensidade superior à das clorinas e porfirinas como se encontra deslocada para a região dos 750 nm. Por último, as isobacterioclorinas, apresentam três bandas Q de intensidade crescente na região dos 500-600 nm e, em contraste aos restantes macrociclos reduzidos, a banda de absorção que surge a maiores comprimentos de onda (QI) é a banda de menor intensidade em todo o espectro de absorção.





Esquema 1.4- Representação gráfica do espectro de visível de macrociclos tetrapirrólicos *meso*-substituídos em diferentes estados de oxidação: a) porfirina; b) clorina c) bacterioclorina; d) isobacterioclorina. Adaptado de [3].

Ainda há a referir que o espectro de visível das porfirinas é dependente da natureza do macrociclo e dos seus grupos substituintes. Apesar da banda Soret ser sempre a banda de maior intensidade, as bandas Q podem apresentar intensidades variáveis. As porfirinas de origem natural apresentam normalmente espectros do tipo “etio” (IV>III>II>I). No entanto, espectros do tipo “rhodo” (III>IV>II>I) “oxo-rhodo” (III>II>IV>I) e “phylo” (IV>II>III>I), são também característicos deste tipo de compostos.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica valiosa que fornece informação estrutural importante acerca deste tipo de derivados. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das porfirinas são normalmente caracterizados pela presença de um sinal a desvios químicos na região dos -2 a -3 ppm, gerados pela ressonância dos prótons internos

**NH.** Já a ressonância dos prótons das posições  $\beta$ -pirrólicas surgem normalmente na zona aromática a desvios químicos na região dos 8-9 ppm enquanto que a 10-11 ppm surgem normalmente os sinais devidos à ressonância dos prótons *meso*.<sup>4</sup> Também a nível dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se observam alterações significativas para os derivados reduzidos. A ausência de ligações duplas relativamente ao macrociclo porfirínico conduz a uma diminuição do fluxo da corrente electrónica o que provoca um aumento do desvio químico para o sinal gerado pela ressonância dos prótons internos **NH** e numa diminuição do desvio químico para o(s) sinal (ais) gerado(s) pela ressonância dos prótons *meso* e  $\beta$ -pirrólicos.

### 1.3- Aplicações

O grande impulso na Química dos compostos tetrapirrólicos surgiu pela mão de Hans Fischer e da sua escola quando, após intensos anos de pesquisa, caracterizaram estruturalmente o grupo heme via síntese total, e relacionaram a sua estrutura com a estrutura da clorofila.<sup>5</sup>

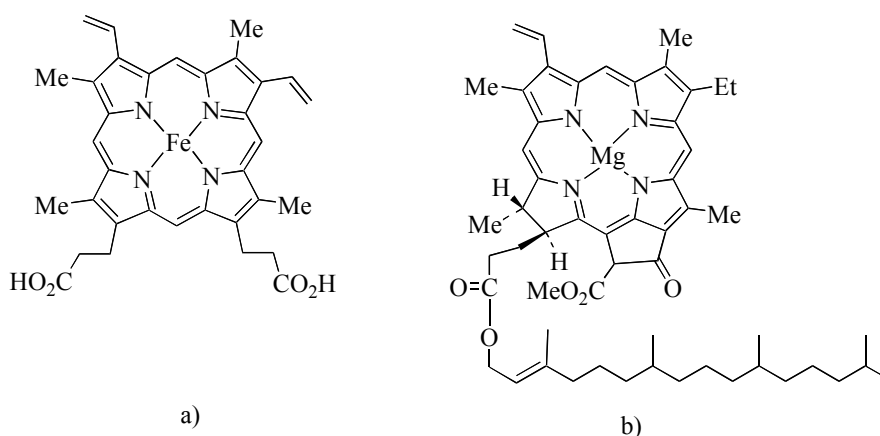


Figura 1.1- Grupo heme (a) e clorofila a (b)

Estavam assim estabelecidas as estruturas dos compostos responsáveis pelo desenvolvimento de funções vitais essenciais à vida como a respiração e fotossíntese, justificando o facto destes compostos serem normalmente designados como “pigmentos da vida”.

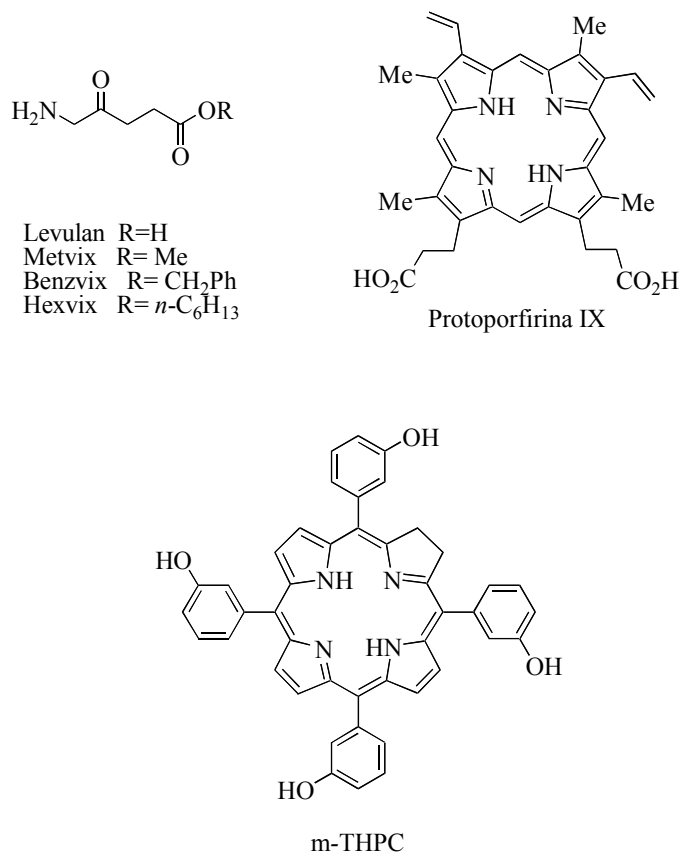
Desde então, inúmeros investigadores dedicaram o seu trabalho à síntese e ao estudo das propriedades e reactividade dos macrociclos tetrapirrólicos, referindo-os como compostos com enormes potencialidades em diversas áreas. Salientam-se as suas aplicações na área da medicina, nomeadamente em terapia fotodinâmica (PDT) e fotodiagnóstico (FD) de situações tumorais.

De uma forma geral, estas duas técnicas tiram partido da acumulação preferencial destes compostos em tecidos neoplásicos e da acção conjugada destes com o oxigénio e com radiação de comprimento de onda adequado. No caso da PDT, a absorção de radiação incidente pelo fotossensibilizador exógeno dá início a uma série de processos que culminam na morte das células neoplásicas. Por sua vez, no processo de diagnóstico, a absorção de radiação pelo fotossensibilizador conduz à emissão de fluorescência característica, permitindo desta forma a visualização da área afectada pela neoplasia. O mecanismo de acção destas duas técnicas será discutido com algum pormenor na secção 1.4.2.

Ainda a nível do processo terapêutico, algumas formulações que têm no seu princípio activo compostos de tipo porfirínico, mereceram já a aprovação de vários organismos que tutelam e vigiam a sua utilização em vários países. A primeira formulação usada foi designada por Photofrin<sup>®</sup> e o seu uso clínico foi aprovado pela primeira vez no Canadá, em 1993. Posteriormente, esta formulação foi também aprovada na Holanda, Japão, Estados Unidos, França, Finlândia, Alemanha, Portugal, Inglaterra, e mais recentemente em Itália, na Irlanda e na Suécia.<sup>6</sup> No entanto, apesar da sua eficiência no tratamento de alguns tipos de neoplasias, Photofrin<sup>®</sup> apresenta algumas desvantagens: trata-se de uma mistura complexa e variável de macrociclos porfirínicos, contendo espécies oligoméricas; a sua aplicabilidade medicinal é limitada por não ser possível identificar os componentes activos responsáveis pela sua actividade biológica. Por outro lado, os doentes tratados com esta formulação apresentam elevados riscos de fotossensibilidade cutânea mediante exposição à luz.<sup>7</sup>

Actualmente, outras formulações baseadas em derivados porfirínicos, já foram aceites para aplicação clínica em PDT (Esquema 1.5), como o ácido 5-aminolevulínico (Levulan), precursor da protoporfirina-IX e os seus ésteres metílico (Metvix), hexílico (Hexvix) e benzílico (Benzvix) e também fotossensibilizadores exógenos como a *m*-

tetrahidroxifenilclorina (m-THPC, Foscan) e o complexo de lutécio de texafirina (Lutex, Motexafin Lutetium).<sup>8</sup>



Esquema 1.5- Alguns fotossensibilizadores usados em PDT.

Dado que todos estes fotossensibilizadores apresentam, quando excitados, emissão de fluorescência, têm sido utilizados simultaneamente em PDT e em fotodiagnóstico; a fluorescência exibida pelos fotossensibilizadores permite visualizar a área ainda afectada durante o tratamento.

De facto, um dos principais problemas associados às doenças oncológicas é a ausência de sintomas específicos no início do seu desenvolvimento. Este factor contribui para que, na maioria dos casos, o diagnóstico seja efectuado em fases avançadas de doença o que, quando associado à localização do tumor em áreas de difícil acesso, diminui substancialmente as hipóteses de cura. Apesar do cenário pouco favorável, sabe-se que a probabilidade de cura deste tipo de situações malignas aumenta consideravelmente quando efectuado um diagnóstico atempado e eficaz. Existe pois, uma enorme necessidade de fotossensibilizadores específicos para diagnóstico. A síntese de derivados porfirínicos

adequadamente substituídos que, de forma análoga aos usados em PDT, se acumulem preferencialmente em tecidos tumorais mas que sejam simultaneamente bons fluóforos e que não provoquem morte celular é, sem dúvida, um dos caminhos a explorar.

Actualmente, o precursor da protoporfirina IX, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), bem como os respectivos ésteres são também usados para a detecção de situações cancerígenas.<sup>8</sup> No entanto, estudos desenvolvidos com outras moléculas porfirínicas, apresentam-se também como alternativas credíveis para fotodiagnóstico. A título de exemplo, salientam-se alguns dos trabalhos desenvolvidos nesta área, nomeadamente os que se basearam no acoplamento de moléculas de carotenóides a porfirinas.<sup>9-12</sup> Estes trabalhos fundamentaram-se no importante papel dos carotenóides no processo fotossintético.<sup>13-15</sup> Estas moléculas actuam como supressores do estado tripleto das moléculas de clorofila que, sendo este estado muito reactivo, poderia culminar em reacções de fotossensibilização do oxigénio molecular com consequente formação de oxigénio singuleto. Esta espécie é altamente citotóxica e responsável, no caso da PDT, pelo processo de morte das células tumorais. No entanto, estudos farmacocinéticos revelam que estes derivados de tipo porfirina-carotenóide apresentam como grande desvantagem o facto de se acumularem no fígado.<sup>10</sup> Esta acumulação, que não diminui significativamente ao longo do tempo, poderá perturbar o bom funcionamento do fígado e conduzir ao aparecimento de alguns efeitos secundários indesejáveis.

Publicações mais recentes revelam a possibilidade do diagnóstico de neoplasias ser efectuado com base no aumento de fluorescência exibida pelo sangue.<sup>16</sup> Este aumento deve-se ao facto de pessoas portadoras de neoplasias apresentarem níveis superiores de porfirinas acumuladas em células tumorais relativamente a pessoas saudáveis, sendo estas porfirinas facilmente arrastadas pelo fluxo sanguíneo. Contudo, este tipo de diagnóstico apenas detecta estados de doença e não permite distinguir tipos de tumores.

O desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas e de imagem, nomeadamente ressonância magnética nuclear de <sup>19</sup>F *in vivo*, assume um papel essencial no que concerne à aplicação de derivados porfirínicos fluorados em diagnóstico de neoplasias.<sup>17-20</sup> As vantagens da aplicação desta técnica prendem-se com o facto de compostos orgânicos fluorados serem raros em sistemas biológicos, o que diminui a probabilidade da existência de diagnósticos positivos falsos devido à presença destes compostos em sistemas não afectados pela doença.

## 1.4- Terapia Fotodinâmica e Fotodiagnóstico

### 1.4.1-Conceitos fotofísicos: nota introdutória

Tal como já foi referido, a PDT e o FD tiram partido da acção conjugada de um fotossensibilizador e de radiação de um determinado comprimento de onda.

Será portanto importante referir, de forma sucinta, alguns parâmetros fotofísicos que envolvem a absorção de radiação e que são relevantes na avaliação do potencial de um fotossensibilizador na aplicação em fotodiagnóstico e/ou tratamento.

O trajecto percorrido por uma molécula desde que absorve radiação até retomar ao estado fundamental, mais estável e de menor energia, é representado pelo diagrama de Jablonski (Figura 1.3). Vários processos podem estar envolvidos neste decaimento energético e são classificados em dois grupos: os que ocorrem com emissão de radiação (processos radiativos: fluorescência e fosforescência) e os que ocorrem na ausência de emissão de radiação (processos não radiativos: conversão intersistemas, conversão interna e reacções de fotossensibilização).

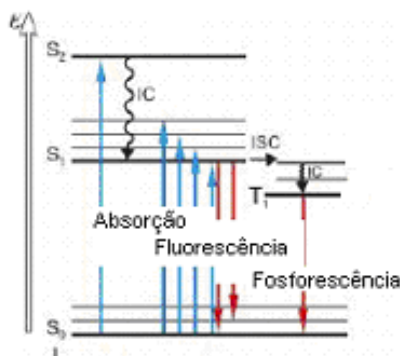


Figura 1.3- Diagrama de Jablonski modificado.

Basicamente, quando uma molécula absorve um fóton e um dos electrões é promovido para uma orbital de maior energia ele poderá ocupar, desde que possua energia suficiente, qualquer um dos estados excitados singuleto ( $S_n$ ). Quando o estado singuleto ocupado corresponde a  $n > 1$ , podem ocorrer processos de conversão interna que o conduzem ao estado excitado singuleto de menor energia ( $S_1$ ).<sup>21</sup>

Os processos de decaimento energético de  $S_1$  para  $S_0$  podem ocorrer com emissão de radiação (processo radiativo) ou com perda de energia sob a forma de calor (processo térmico). O primeiro é designado por fluorescência. Neste caso, o comprimento de onda da radiação emitida é superior ao comprimento de onda da radiação absorvida, uma vez que a molécula ao retomar o estado fundamental poderá ocupar níveis de energia vibracionais e rotacionais superiores aos ocupados previamente à absorção de radiação.

No processo térmico, o calor emitido corresponde à diferença de energia entre o nível ocupado no estado excitado e o nível final no estado fundamental.

Por outro lado, uma molécula no seu estado excitado singuleto pode seguir a via de conversão de intersistemas para o estado excitado tripleto de menor energia. De forma similar ao decaimento do estado singuleto excitado para o estado fundamental, a perda energética com origem no estado excitado tripleto, pode ser acompanhada por perda de energia sob a forma de calor ou por emissão de radiação (fosforescência). No processo de fosforescência, o comprimento de onda da radiação emitida é muito superior ao comprimento de onda da radiação absorvida e ao comprimento de onda da radiação emitida por fluorescência. Este facto é facilmente justificado com base nas diferenças energéticas entre os três estados supra mencionados: a diferença de energia entre o estado excitado tripleto e o estado fundamental singuleto é inferior à diferença de energia entre o estado excitado singuleto e o estado fundamental singuleto.

Por último, uma molécula no estado excitado tripleto pode ainda transferir a sua energia para uma molécula no estado fundamental, promovendo a excitação desta última a um estado de maior energia. Este tipo de reacções é designado por reacções de fotossensibilização e é responsável pela participação de moléculas orgânicas em reacções fotoquímicas quando estas são irradiadas com radiação de um certo comprimento de onda onde não é característica a sua absorção. Este processo pode ser considerado um processo catalítico dado que após transferência energética ocorre regeneração do fotossensibilizador.<sup>6</sup>



Uma das grandezas que explica o comportamento fotofísico de moléculas é definida como rendimento quântico e representa, para qualquer processo, a razão entre o número de fotões usados ( $n_{fp}$ ) e o número total de fotões absorvidos pela molécula ( $n_{fa}$ ).

Esta grandeza assume valores compreendidos no intervalo 0-1, uma vez que, exceptuando o caso das reacções em cadeia, cada fotão absorvido excita apenas uma molécula orgânica.

$$\phi = n_{fp}/n_{fa}$$

Por exemplo, um rendimento quântico de fluorescência de 0,5 significa que 50 % dos fotões absorvidos por uma dada molécula orgânica conduziram ao seu decaimento energético directamente do estado excitado singuleto para o estado fundamental com emissão de radiação (fluorescência).

Ainda há a referir que a soma dos rendimentos quânticos dos processos que envolvem directamente a participação de fotões (fluorescência  $\phi_F$ , fosforescência  $\phi_P$ , estado singuleto  $\phi_s$ , estado tripleto  $\phi_T$  e conversão intersistemas  $\phi_{isc}$ ) é inferior ou igual à unidade:<sup>8</sup>

$$\sum \phi \leq 1$$

Esta lei fotofísica comprova a necessidade de encontrar fotossensibilizadores específicos para aplicação em fotodiagnóstico. Como será explicado nas secções seguintes, um fotossensibilizador adequado para aplicação em PDT deverá apresentar um elevado rendimento quântico de estado tripleto. Em contrapartida, um fotossensibilizador ideal para aplicação em fotodiagnóstico deverá apresentar um rendimento quântico fluorescência bastante superior ao apresentado para o estado tripleto. Desta forma, e dado que a soma de todos estes processos deverá ser inferior à unidade, a mesma molécula não poderá satisfazer estes dois requisitos. Assim a aplicação da mesma molécula no processo terapêutico e no processo de diagnóstico, apesar de ser possível, poderá ocorrer com eficiência limitada para um ou mesmo para ambos os processos.

#### 1.4.2- Princípios básicos de PDT e de FD

O modo terapêutico (PDT) é iniciado pela absorção de radiação pelo fotossensibilizador, que o promove ao estado excitado singuleto. Se o decaimento energético deste estado excitado ocorrer preferencialmente via uma interconversão de



sistemas, origina o estado excitado tripleto do fotossensibilizador. A reacção de fototoxicidade pode-se desenrolar por dois mecanismos distintos:<sup>21-24</sup>

1- Mecanismo do tipo I- envolve reacções entre o estado tripleto do fotossensibilizador e substratos biológicos. Este mecanismo envolve a abstracção de átomos de hidrogénio ou a transferência electrónica entre o fotossensibilizador excitado e o substrato em questão, conduzindo ao aparecimento de espécies radicalares, que causam danos celulares.

2.- Mecanismo do tipo II- O decaimento energético do estado tripleto do fotossensibilizador ocorre por transferência de energia para o  $^3\text{O}_2$ , culminando com a formação de  $^1\text{O}_2$ , espécie muito reactiva capaz de causar também danos a nível celular.

É de relembrar que o oxigénio molecular no estado fundamental é o oxigénio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). O oxigénio no estado singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) apresenta um carácter electrofilico superior ao oxigénio molecular. Sendo um oxidante muito poderoso, é usado em química laboratorial para promover a oxidação de fenóis, grupos amina, entre outros e pode participar ainda como dienófilo em reacções de cicloadição [4+2].<sup>23</sup> Quando presente em substratos biológicos, reage rapidamente com os sistemas celulares, nomeadamente ao nível da mitocôndria, retículo endoplasmático, sistema de Golgi e lisossomas.<sup>10,11</sup> A reacção em locais de insaturação e outros presentes nas biomoléculas pode conduzir à morte celular. É este efeito citotóxico, apresentado pelo oxigénio singuleto, o responsável pela actividade necrótica.

O fotodiagnóstico de neoplasias rege-se pelos mesmos princípios da terapia fotodinâmica, tirando partido da acumulação preferencial de um fotossensibilizador em tecidos tumorais e da posterior irradiação com luz de um comprimento de onda adequado. Para este tipo de aplicação, como já foi referido, o estado excitado de maior importância é estado excitado singuleto, assumido pelo fotossensibilizador após absorção da radiação incidente. O seu decaimento energético via emissão de radiação (fluorescência) deve ser preferencial face aos restantes processos de decaimento e a formação do oxigénio singuleto deverá ser minimizada ou, idealmente, eliminada. Este requisito é compatível com o objectivo do fotodiagnóstico: a visualização atempada e de forma não evasiva de tecidos

cancerígenos mediante a observação da emissão de fluorescência de um marcador que revele acumulação preferencial neste tipo de tecidos.

#### 1.4.3- Principais características de um bom fotossensibilizador em PDT e FD

Os compostos que se destinam a aplicações nestas duas áreas deverão apresentar algumas características comuns que passamos a enunciar:<sup>22, 25</sup>

- 1- Elevado coeficiente de absorção na região do espectro electromagnético correspondente ao comprimento de onda de excitação pretendido.
- 2- Composto puro, de síntese fácil, elevada reprodutibilidade e bons rendimentos.
- 3- Apresentar acumulação preferencial em células tumorais (face a células saudáveis).
- 4- Não ser tóxico na ausência de luz.
- 5- Facilmente solúvel nos fluidos corporais e de rápida eliminação.

Os compostos com aplicação potencial em PDT devem também apresentar outras características que favoreçam a formação de  $^1\text{O}_2$  de forma a promover a actividade terapêutica. Assim, são esperados elevados rendimentos quânticos de formação de estado tripleto ( $\phi_T$ ) e elevados tempos de vida de estado excitado tripleto ( $\tau_T$ ).

Por seu turno, fotossensibilizadores com potencial aplicação em fotodiagnóstico, devem, em adição às características mencionadas anteriormente, ser maus geradores de  $^1\text{O}_2$ , de forma a que seja favorecido o processo de fluorescência. Relativamente aos tempos de vida do estado excitado tripleto, alguns estudos efectuados prevêm que compostos com tempos de vida de estado tripleto superiores a 1 ms encontrem aplicação em PDT, enquanto que compostos que apresentem tempos de vida de estado tripleto da ordem dos 1  $\mu\text{s}$  sejam indicados para FD.<sup>26, 27</sup>

Esta regra baseia-se na equação que define o rendimento quântico de formação de  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_\Delta$ ), quando estamos na presença de um mecanismo do tipo II:

$$\phi_\Delta = k_{\text{et}} [^3\text{O}_2] / (k_{\text{et}} [^3\text{O}_2] + k_p)$$

em que  $k_{et}$  representa a constante de velocidade de transferência de energia do estado tripleto do fotossensibilizador para o oxigénio molecular, representando  $[^3O_2]$  a concentração efectiva de oxigénio no meio e  $k_p$  a soma das constantes de velocidade dos processos de decaimento energético radiativo e não radiativo na ausência de oxigénio. Sabendo que  $k_p = 1/\tau_p$ , em que  $\tau_p$  representa o tempo de vida do estado tripleto na ausência de  $O_2$  e, procedendo à sua substituição na expressão anterior, verifica-se que  $\phi_\Delta$  varia na razão inversa de  $k_p$  e na razão directa de  $\tau_p$ . Efectivamente, o estado excitado tripleto dum fotossensibilizador apresenta um tempo de vida superior ao seu estado excitado singuleto, o que permite a ocorrência de reacções de transferência de energia entre as duas moléculas, neste caso entre o fotossensibilizador e o oxigénio molecular.

Ainda há a referir que estas conclusões podem também ser aplicadas a mecanismos do tipo I, uma vez que o estado tripleto do fotossensibilizador é o estado de partida de ambos os mecanismos.

#### **1.4.4- Incorporação e localização celulares**

A incorporação e a localização celular dos fotossensibilizadores são também factores determinantes para a sua eficiência.

As porfirinas, assim como os seus derivados, possuem a capacidade de serem preferencialmente retidos pelas células de tecidos neoplásicos face a células normais dos tecidos circundantes. Esta é uma das características mais importantes evidenciada pelos macrociclos tetrapirrólicos e uma das que viabiliza a sua aplicação em áreas medicinais como o diagnóstico e terapia de cancro.

O mecanismo que torna esta acumulação preferencial ainda não se encontra completamente esclarecido. Nas últimas décadas, diversos estudos realizados relacionam a acumulação de porfirinas pelos tecidos tumorais com a presença de proteínas lipídicas de baixa densidade, designadas por LDL, e com o pH do meio intra e extracelular de células tumorais e de células normais.<sup>28-30</sup>

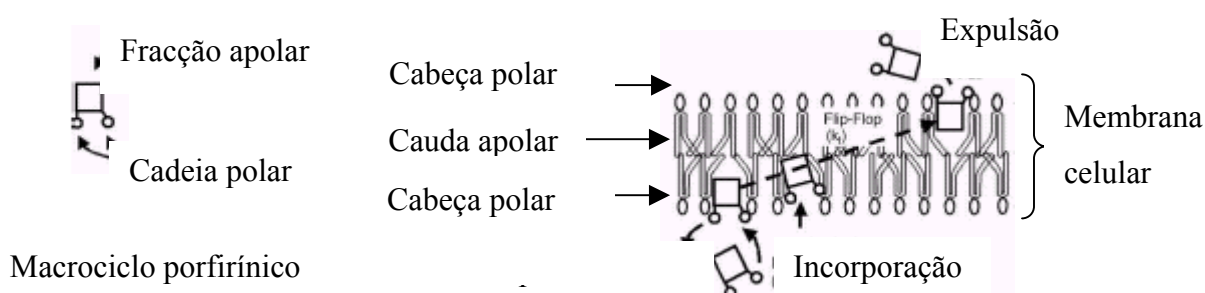
O percurso do macrociclo porfirínico após administração intravenosa (até às células tumorais) apresenta-se dependente de características como a sua solubilidade. Apenas porfirinas hidrofílicas podem circular livremente através do fluxo sanguíneo.<sup>31</sup> Contudo,

porfirinas anfifílicas ou lipofílicas possuem elevada afinidade para as LDL (Figura 1.4).<sup>29</sup> Uma das características das células cancerígenas é a de apresentarem um metabolismo catabólico de colesterol acelerado, que lhes confere uma elevada concentração de receptores LDL. Desta forma as proteínas lipídicas de baixa densidade podem funcionar como transportadores deste tipo de fotossensibilizadores e assegurar a sua retenção em tecidos tumorais.



**Figura 1.4-** Provável mecanismo de interacção entre LDL e fotossensibilizadores com carácter anfifílico.<sup>29</sup>

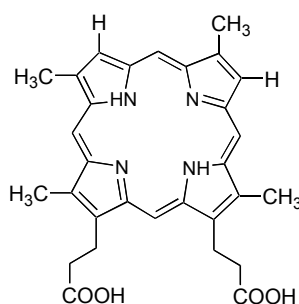
A interacção entre o macrociclo porfirínico e a parede celular (Figura 1.5) ocorre de forma a orientar as componentes hidrofóbica e hidrofílica do macrociclo com a cauda carbonada e a cabeça polar da primeira camada fosfolipídica da parede celular, respectivamente. Um mecanismo de “flip-flop” acompanhando a constituição da parede celular de forma a manter a mesma orientação, permite a progressão do fotossensibilizador em direcção ao meio intracelular.



**Figura 1.5-** Mecanismo provável de incorporação de porfirinas nas células tumorais.<sup>18</sup>

Este estudo permite concluir que os substituintes da cadeia lateral do macrociclo porfirínico, assim como a simetria da molécula, poderão desempenhar um papel fundamental na sua incorporação na célula.

O pH é outro factor que poderá desempenhar um papel importante na incorporação destes compostos em células tumorais. O pH de tecidos tumorais é significativamente mais baixo do que o pH de tecidos normais. Porfirinas do tipo da deuteroporfirina (Figura 1.6) com as características anfífilicas e de simetria adequadas para serem incorporadas em células, encontram-se no meio extracelular na forma neutra o que facilita a sua entrada na membrana celular. No meio intracelular, os grupos carboxilos encontram-se nas formas mono e/ou dianiónicas, tornando a molécula menos lipofílica o que dificulta a sua eliminação.



**Figura 1.6-** Deuteroporfirina

A baixa incorporação de porfirinas protonadas também se justifica pela sua hidrofilicidade. Outra característica que também poderá contribuir para a acumulação dos fotossensibilizadores nas células hiper-proliferativas é a reduzida drenagem linfática apresentada pelos tecidos doentes.

Relativamente à localização destes compostos nos organelos celulares, verifica-se que as características referidas anteriormente assumem também um papel importante. Moléculas lipofílicas apresentam maior tendência para se localizarem em componentes lipofílicos, como membranas celulares de vários organelos, enquanto que macrociclos aniónicos acumulam-se preferencialmente na membrana citoplasmática (os de carácter mais lipofílico) ou em lisossomas (os mais hidrofílicos).

Relativamente a estados de agregação, vários estudos realizados revelam que os agregados diméricos apresentam tendência a difundirem-se por toda a célula, apresentado uma maior acumulação na membrana plasmática, enquanto que os monómeros se localizam em vários organelos, nomeadamente no núcleo e mitocôndria.<sup>32</sup>

#### **1.4.5- Fotodiagnóstico *via* ácido 5-aminolevulínico**

A aplicação do ácido 5-aminolevulínico em fotodiagnóstico de neoplasias é feita mediante uma técnica designada por fotossensibilização endógena em que o fotossensibilizador é biossintetizado por administração externa de um dos seus precursores naturais.

O ácido 5-aminolevulínico é um precursor natural do grupo prostético Heme (Figura 1.7). Desta forma, seria suposto que a sua administração externa culminasse na acumulação de heme, o que não se verifica. Mediante a aplicação externa (tópica ou sistémica) de ácido 5-aminolevulínico, este é rapidamente metabolizado pelo organismo verificando-se uma acumulação rápida de um marcador fluorescente, a protoporfirina IX, nos tecidos doentes.

##### *1.4.5.1- Metabolismo do ALA*

A biossíntese de ALA ocorre na mitocôndria mediante a condensação de uma unidade de glicina e de uma unidade de succinil CoA. Esta reacção é catalisada pela enzima ALA sintase. A formação enzimática do porfobilinogénio ocorre mediante a condensação de duas moléculas de ALA acompanhada da libertação de duas moléculas de água. A condensação de quatro moléculas de porfobilinogénio e posterior ciclização culminam na formação de um outro intermediário - o uroporfirinogénio III. A descarboxilação de todas as cadeias de ácido acético a grupos metilo é catalisada pela enzima uroporfirinogénio descarboxilase e promove a síntese do coproporfirinogénio III.

O coproporfirinogénio III entra na mitocôndria onde ocorrem diversas transformações enzimáticas que envolvem a descarboxilação e oxidação de dois grupos propiónicos formando o protoporfirinogénio, precursor da protoporfirina IX. A síntese deste derivado ocorre por oxidação do protoporfirinogénio. O passo final na síntese do

grupo prostético heme pressupõe a incorporação de ferro no interior do macrociclo porfirínico processo catalisado pela enzima heme sintase.<sup>33-37</sup> A concentração do grupo prostético heme assume um papel importante no controle desta biossíntese não permitindo a acumulação de porfirinas no organismo que conduziria a distúrbios metabólicos.

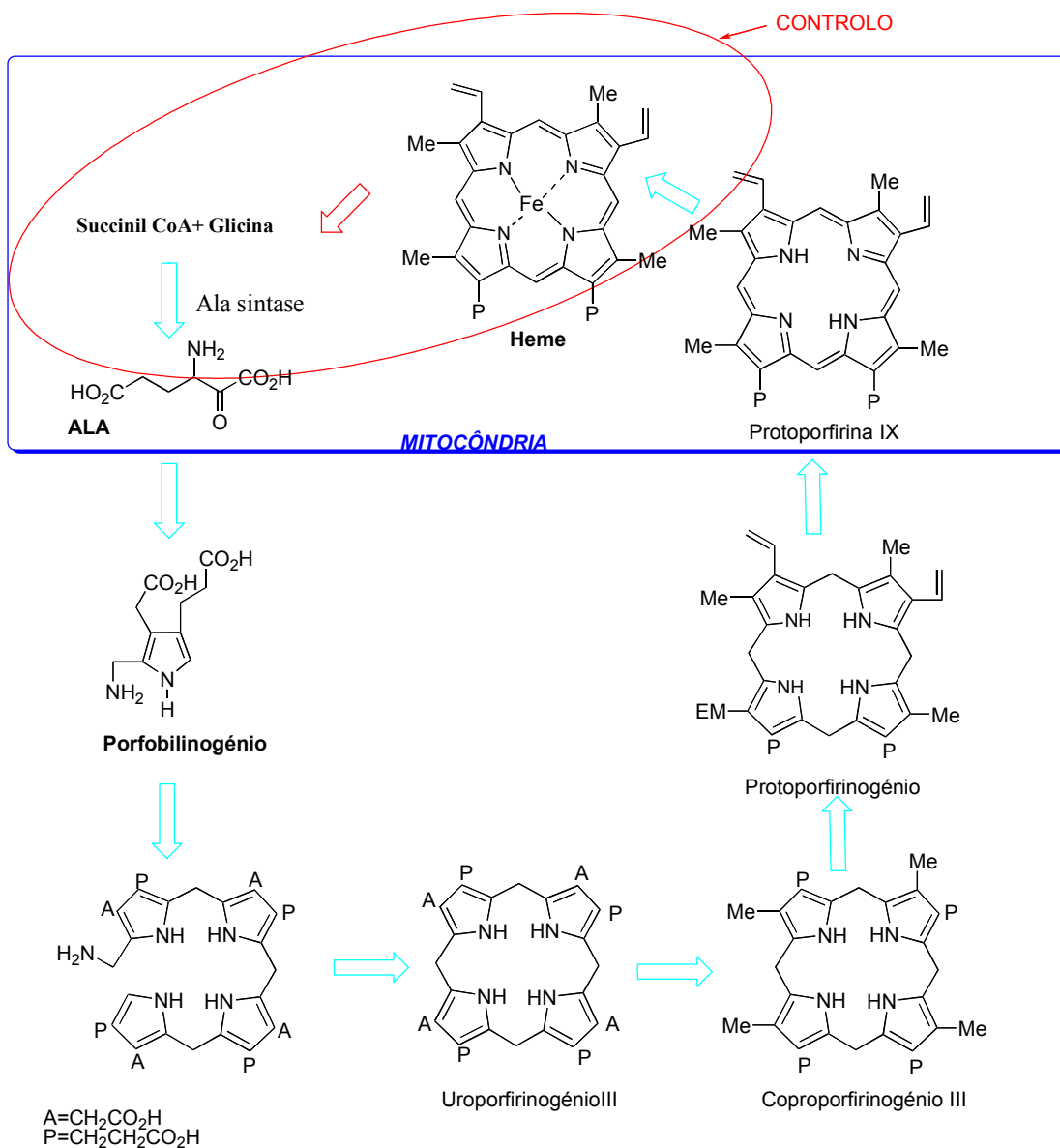


Figura 1.7- Biossíntese do grupo prostético Heme

A administração exógena de ALA ocorre num dos pontos deste ciclo em que o sistema responde apenas à sua presença, permitindo assim a biossíntese de protoporfirina

IX. Alguns dos factores que poderão impedir a biossíntese e acumulação do grupo prostético Heme poderão ser a administração de um elevado excesso de ALA aliada a uma biodisponibilidade limitada de ferro e de enzima heme sintase.

Desta forma a fluorescência exibida pela acumulação de protoporfirina IX nos tecidos doentes é suficiente para permitir a sua detecção mediante a aplicação de técnicas de fluorescência.

A maior vantagem da administração exógena de ALA relativamente a outros fotossensibilizadores é o seu rápido metabolismo que tem como consequência clínica imediata a diminuição drástica do período de fotossensibilidade cutânea. Por exemplo, doentes que foram sujeitos a tratamento com HpD deverão evitar o contacto com a luz solar durante um período que abrange duas semanas a três meses. No caso de doentes tratados com ALA, a fotossensibilização é apenas manifestada durante um período de cerca de vinte e quatro horas.

Outros estudos têm sido realizados com o intuito de aumentar o desempenho da fotossensibilização endógena.<sup>34</sup> A esterificação dos grupos carboxilos do ALA aumenta a lipofobicidade da molécula o que é uma vantagem relativamente ao transporte e incorporação destes derivados nas células alvo. No entanto, é necessário que ocorra a clivagem enzimática dos grupos éster antes da entrada do ALA na biossíntese da protoporfirina IX. Desta forma, a biodisponibilidade da esterase poderá influenciar o sucesso deste processo. No entanto, se se verificar uma incorporação superior com estes derivados, poder-se-á obter uma maior concentração de protoporfirina IX a uma menor concentração de droga administrada, aumentando desta forma a fluorescência observada e facilitando o diagnóstico.

O objectivo do trabalho realizado foi o de contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas de tipo porfirínico com potencial aplicação em fotodiagnóstico. Dedicámo-nos portanto ao estudo da síntese, caracterização estrutural e avaliação biológica de moléculas resultantes do acoplamento de unidades estruturais com propriedades biológicas conhecidas e relevantes, de forma a inferir acerca da introdução de alterações estruturais no macrociclo porfirínico tornando-o mais específico para a aplicação requerida.

Desta forma, na primeira parte deste trabalho, foram preparados novos derivados porfirínicos resultantes do acoplamento de moléculas de porfirina a uma calcona, nas



posições *meso* do macrociclo porfirínico, procedendo de seguida à sua avaliação biológica. A última, teve como base a avaliação do efeito do número de substituintes de tipo calcona e do tipo de substituintes do macrociclo porfirínico na citotoxicidade apresentada, assim como nas alterações na morfologia, localização e acumulação para uma dada linha celular. Uma vez que os resultados obtidos foram interessantes, ainda na primeira parte do trabalho é descrita a síntese de novos macrociclos porfirínicos acoplados a derivados de *N*-flavonilglicinas desta vez na posição  $\beta$ -pirrólica.

Na segunda parte, e na sequência de outros estudos realizados no nosso grupo de investigação, foram sintetizados conjugados de tipo porfirina-aminoácido e diporfirina-aminoácido, resultantes do acoplamento de aminoácidos naturais e ésteres de aminoácidos também a macrociclos porfirínicos. A caracterização estrutural por espectrometria de massa em electrospray conduziu a resultados interessantes relativamente ao tipo de fragmentação destes novos derivados, pelo que será também um assunto abordado em pormenor.

## 1.5- Referências

1. Scheer, H, "Synthesis and Stereochemistry of Hidroporphyrins" em "The Porphyrins", editado por D. Dolphin, Academic Press, New York, 1978, vol 2, pg 1-37.
3. "Transformações de cicloadição e síntese de novos macrociclos tetrapirrólicos", Silva, AM, Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, 2002.
4. Scheer, H, Katz, JJ "Porphyrins and Metalloporphyrins", editado por K. M. Smith, Elsevier, Amsterdam, 1975, cap 10, 399.
5. <http://www.nibel.se/chemistry/laureates/1930/fischer-lecture.pdf>.
6. Vicente, MGM, *Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents*, **2001**, 1: 175.
7. Nyman, ES, Hynninen, PH, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **2004**, 73: 1.
8. Detty, MR, Gibson, SL, Wagner, SJ, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47: 3897.
9. Cardoso, SL, Nicodem, D., Moore, TA, Moore, AL, Gust, D, *J. Braz. Chem. Soc.*, **1996**, 7: 19.
10. Reddi, E, Segalla, A, Jori, G, Kerrigan, PK, Liddell, A, Moore, AL, Gust, D, *Br. J. Cancer*, **1994**, 69: 40.
11. Gust, D, Moore, T, Moore, AL, Devadoss, C, Liddell, PA, Hermant, R, Nieman, RA, Demanche, LJ, DeGraziano, JM, Gouni, I, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114: 3590.
12. Dirks, G, Moore, AL, Moore, TA, Gust, D, *Photochem. Photobiol.*, **1980**, 32: 277.
13. web site: <http://biology.clc.uc.edu/courses/bio104photosyn.htm>.
14. Communications to the editor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92: 5216.
15. Moore, AL, Dirks, G, Gust, D, Moore, TA, *Photochem. Photobiol.*, **1980**, 32: 691.
16. Masilamani, V, Al-Zhrani, K, Al-Salhi, M, Al-Diab, A, Al-Ageily, M, *Journal of Luminescence*, web-site: <http://www.elsevier.com/locate/biocel>.
17. Kumadaki, I, Ando, A, Omote, M, *J. Fluor. Chem.*, **2001**, 109: 67.
- 18- Pandey, SK, Gryshuk, AL, Ohkubo, K, Fukusumi, S, Doblach, MP, Zheng, G, Ou, Z, Kadish, KM, Oseroff, A, Ramaprasad, S, Pandey, RK, *Tetrahedron*, **2003**, 59: 10059.
19. Ando, A, Kumadaki, I, *J. Fluor. Chem.*, **1999**, 100: 135.
20. Pandey, R K, Rao, KRN, Roberts, E, *Tetrahedron Lett.*, **1985**: 793.
21. "Photochemistry and Photobiology- Principles and Applications", Jacques Kagan, Academic Press, 1993.

22. Bonnett, R, "Chemical Aspects of Photodynamic Action", editado por Gordon and Breach, Londres, 2000.
23. DeRosa, MC, Crutchley, R. J., *Coord. Chem. Rev.*, **2002**: 351.
24. MacDonald, I, Dougherty, T, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5: 105.
25. "The Colours of Life", Milgrom, L., R., Oxford University Press, Oxford, **1997**.
26. Takemura, T, Nakajima, S, Sakata, I, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 59: 366.
27. Takemura, T, Ohta, N, Sakata, I, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 50: 339.
28. Nakajima, S, Takemura, T, Sakata, I, *Cancer Lett.*, **1995**: 113.
29. Bonneau, S, Morlière, P, Brault, D, *Biochemical Pharmacology*, **2004**, web site: <http://www.elsevier.com/locate/biochempharm>.
30. Riccelli, F, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1995**, 29: 109.
31. Figueiredo, T, Jonhstone, RAW, Sorensen, AMP, Burget, D, Jacques, P, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 69(5): 517.
32. Seilitz, HK, Scheneckenburger, H, Stetmaier, J, *Photochem. Photoobiol. B.*, **1990**, 5: 391.
33. Keltly, CJ, Brown, NJ, Reed, MWR, Ackroyd, R, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, 1: 158.
34. Uehlinger, P, Zellweger, M, Wagnières, G, Jeanneret, L, Bergh, H, Lange, N, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **2000**, 54: 72.
35. Fukuda, H, Casas, A, Battle, A, *The Internacional Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2004**, web site: [http:// www.elsevier.com/locate/biocel](http://www.elsevier.com/locate/biocel)
36. Baumgarner, R, Huber, RM, Schulz, H, Stepp, H, Rick, K, Gamarra, F, Leberig, A, Roth, C, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1996**, 36: 169.
37. Novo, M, Huttmann, G, Diddens, H, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1996**, 34: 143.

## **Capítulo II**

Síntese e avaliação biológica de porfirinas  
acopladas a flavonóides



## 2.1-Flavonóides: considerações gerais

Os flavonóides são compostos fenólicos isolados de várias plantas. São conhecidos por serem biologicamente activos actuando como antialérgicos, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórios, e vasodilatadores.<sup>1-8</sup> Estes compostos apresentam estruturas policíclicas com dois anéis aromáticos (A e B), ligados em alguns casos por um anel central (anel C). A família dos flavonóides é subdividida em subclasses (calconas, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis), de acordo com o nível de saturação e a abertura/fecho do anel central (Figura 2.1).

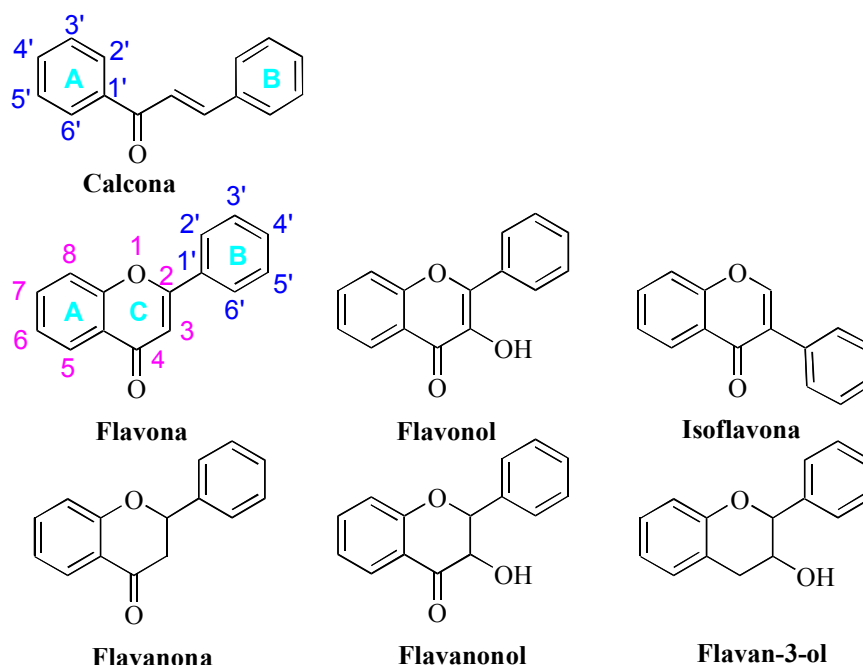


Figura 2.1- Estrutura base de núcleos de algumas subclasses da família dos flavonóides e numeração recomendada pela IUPAC para esta família de compostos.

Face ao interesse na procura de novas moléculas para o tratamento e diagnóstico de neoplasias, centrámos a nossa atenção nas propriedades anticancerígenas e antioxidantes destes compostos.

Nas últimas décadas, alguns estudos realizados sugerem a existência de correlação directa entre a ingestão de flavonóides e o decréscimo de risco de aparecimento de

cancro.<sup>1-3</sup> A relação entre estrutura/actividade deste tipo de compostos parece estar dependente do número, tipo e posição dos grupos substituintes.<sup>1, 5-9</sup>

Os flavonóides parecem desenvolver a sua actividade anticancerígena através da inibição, reversão ou retardamento da hiperproliferação celular. Estes compostos são particularmente eficientes na inibição das enzimas que catalisam a formação de espécies reactivas de oxigénio (ciclo-oxigenase, lipo-oxigenases) e na inibição da enzima ornitina descarboxilase responsável pela síntese de nucleótidos. A inibição destas enzimas limita a síntese de DNA e a actividade proliferativa de células cancerígenas.<sup>2</sup> São também efectivos na inibição de enzimas envolvidas na regulação de proliferação celular como as PTK (proteína tirosina cinase), PCK (proteína C cinase) e PIP<sub>3</sub> (fosfoinositidina 3-cinases).<sup>3</sup>

Por outro lado, os flavonóides podem eliminar vários factores que poderão dar início ao estado de doença, complexando metais e podem também reagir como captadores de espécies reactivas de oxigénio.<sup>3,5,6</sup> Aliada a esta enorme vantagem, apresentam citotoxicidade muito baixa (em alguns casos até mesmo nula) para as células humanas saudáveis.<sup>3</sup>

Outro mecanismo envolvido na actividade anticancerígena apresentada pelos flavonóides poderá estar relacionado com a indução de apoptose (forma activa de morte celular que desempenha um papel importante na eliminação de células danificadas).

O grande desafio a que nos propusemos neste trabalho, foi o de sintetizar compostos orgânicos não citotóxicos (quer na presença, quer na ausência de luz), com acumulação preferencial em células cancerígenas face a células normais e que apresentem rendimentos quânticos de fluorescência razoáveis de forma a permitir a visualização da área afectada.

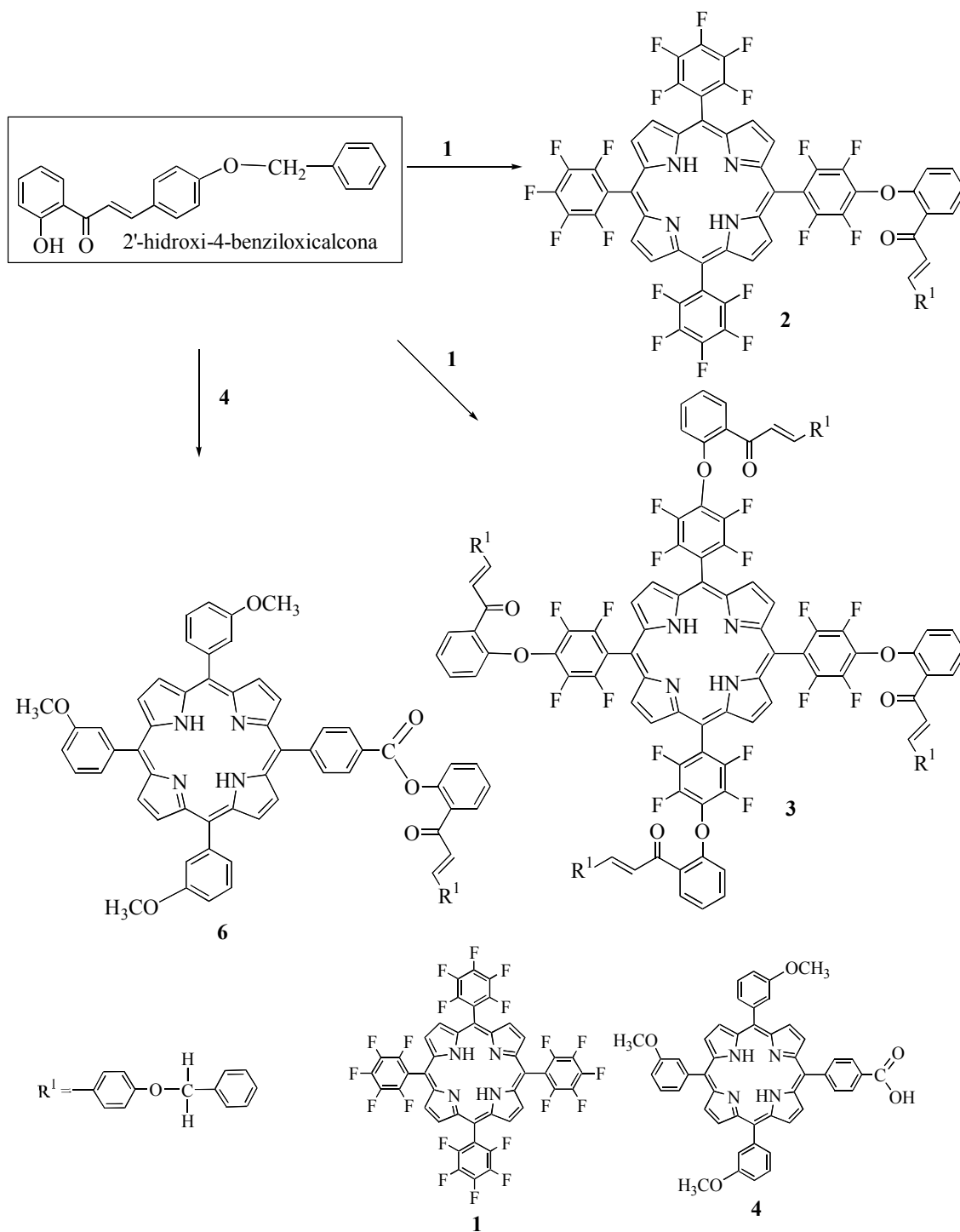
Tal como vimos anteriormente, as porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos que por si só obedecem a algumas das características estruturais exigidas para uma molécula com aplicação em fotodiagnóstico: são, de facto, moléculas fluorescentes que se acumulam preferencialmente em células hiperproliferativas face a células normais, possibilitando um diagnóstico eficaz por monitorização da fluorescência emitida após irradiação. No entanto, um dos principais problemas exibidos pelos macrociclos do tipo porfirínico e que condiciona a sua aplicação nesta vertente medicinal é o facto de serem, geralmente, bons geradores de oxigénio singuleto após irradiação. A presença de oxigénio singuleto no meio

celular, apesar de ser a base do processo fototerapêutico (PDT) é indesejável no processo de fotodiagnóstico.

Na tentativa de tirar partido da selectividade demonstrada pelas porfirinas e da sua fluorescência, assim como da importante actividade biológica dos flavonóides, dedicámo-nos à síntese de novas moléculas contendo estas duas unidades estruturais.

Em primeiro lugar, e tendo como objectivo a funcionalização das posições *meso* de porfirinas, preparámos compostos que resultaram do acoplamento da 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona a 5,10,15,20- tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** e a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina **4**, através de ligações éter e éster, respectivamente (Esquema 2.1).





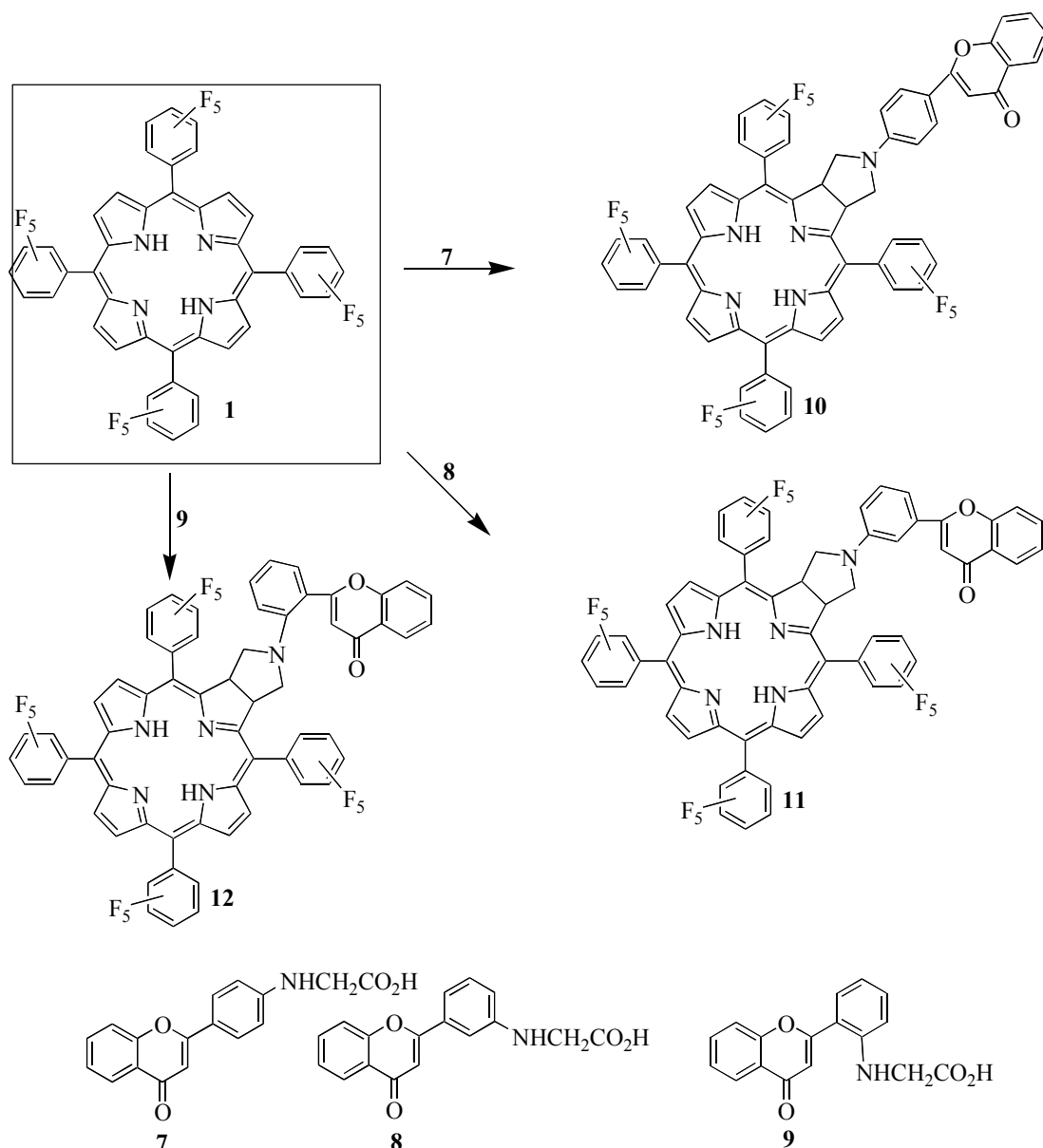
Esquema 2.1

Outro dos factores a ter em conta quando se pretende preparar compostos com possível aplicação em fotodiagnóstico de neoplasias é a zona de absorção no espectro electromagnético. Nas últimas décadas, vários estudos relacionados com terapia fotodinâmica (PDT) foram orientados para a procura de novos derivados com absorção

intensa de radiação na zona do vermelho. Este requisito relaciona-se com o grau de penetração da radiação nos tecidos, que aumenta com o aumento do comprimento de onda da radiação incidente,<sup>9</sup> permitindo não só o tratamento de tumores localizados em zonas menos acessíveis do organismo como também tumores de maiores dimensões. Desta forma, macrociclos reduzidos de tipo clorina, bacterioclorina e isobacterioclorina têm sido extensamente estudadas para aplicação em PDT. Inclusivamente, a degeneração macular da retina relacionada com a idade (DMRI) tem sido tratada usando uma formulação baseada num macrociclo porfirínico de tipo clorina.<sup>10</sup>

Sabendo que, de forma análoga ao processo de PDT, o fotodiagnóstico envolve absorção de radiação, estes macrociclos porfirínicos reduzidos poderão ser úteis, por monitorização de fluorescência emitida, na detecção de situações tumorais em zonas menos acessíveis.

Atendendo aos factos supra-mencionados, foram também preparadas clorinas resultantes do acoplamento da *N*-(4-flavonil)glicina **7**, da *N*-(3-flavonil)glicina **8** e da *N*-(2-flavonil)glicina **9** a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** *via* reacção de cicloadição 1,3-dipolar (Esquema 2.2).



Esquema 2.2

A escolha destes macrociclos tetrapirrólicos para a síntese dos novos derivados, está relacionada com os grupos substituintes que apresentam e com alguns aspectos práticos; a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina é uma porfirina simétrica de fácil síntese e purificação, que pode ser derivatizada por substituição nucleofílica de átomos de flúor e que é considerada um bom dipolarófilo em reacções de cicloadição 1,3-dipolar.<sup>11</sup> Por outro lado, o recente desenvolvimento de técnicas de ressonância magnética nuclear de <sup>19</sup>F para aplicação em diagnóstico de neoplasias, indica que esta é mais uma das áreas de possível aplicação destes derivados.<sup>12-14</sup> Sabendo que as *m*-metoxifenilporfirinas têm

demonstrado uma maior afinidade para os tecidos tumorais levou-nos a seleccionar a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina como a precursora de novos derivados de tipo porfirina-calcona.<sup>15-19</sup>

Estas porfirinas precursoras foram sintetizadas mediante a condensação de pirrol com os aldeídos adequados para cada um dos casos, segundo uma metodologia descrita por Gonsalves *et al.*<sup>20</sup> A porfirina **1** é uma porfirina simétrica com quatro anéis fenilo pentafluorados nas posições *meso* e foi preparada por condensação de pirrol com pentafluorobenzaldeído na proporção de 1:1. Já a porfirina **4**, foi preparada por condensação de pirrol com 4-carboxibenzaldeído e 3-metoxibenzaldeído, em proporções relativas que favoreçam a formação do macrociclo desejado (1:3). Em ambos os casos, a condensação foi conduzida numa mistura de ácido acético/nitrobenzeno a refluxo (secção 2.5.2).

## **2.2- Acoplamento de porfirinas a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona**

### **2.2.1- Acoplamento da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona**

A primeira evidência da ocorrência de substituição nucleofílica regioselectiva de átomos de flúor na 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina, data de 1990 quando Kadish *et al* sintetizaram a 5,10,15,20-tetraquis(2,3,5,6-tetrafluoro-4-dimetilaminofenil)porfirina a partir da reacção daquela porfirina em dimetilformamida (DMF) a refluxo.<sup>21</sup> A presença de dimetilamina no meio reaccional é atribuída à decomposição da DMF nas condições reacionais usadas.

Mais tarde, outros autores centraram os seus estudos nas reacções de acoplamento da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (e de alguns dos seus complexos metálicos) a nucleófilos como aminas secundárias, alcóxidos e tióis.<sup>22</sup> A regioselectividade apresentada em todos os casos é mediada pela alteração da reactividade do anel aromático após a substituição do átomo de flúor da posição mais reactiva. A substituição na posição *para* desactiva o anel aromático substituído, tornando-o menos reactivo do que os restantes.

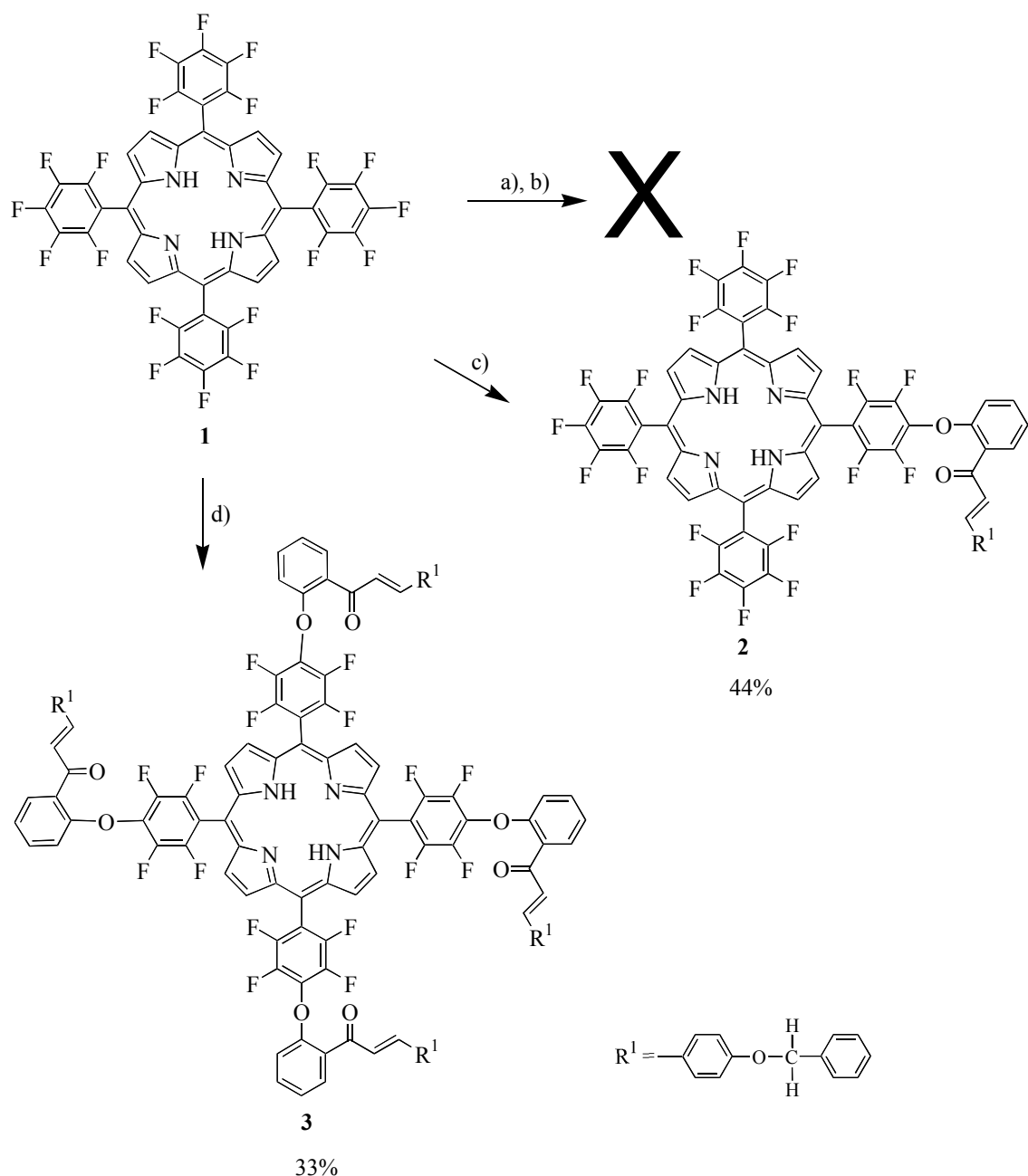
Dada a versatilidade deste tipo de reacções, propusemo-nos a utilizar esta abordagem sintética para a substituição dos átomos de flúor das posições *para* dos fenilos, com vista ao acoplamento da calcona à porfirina **1**.

#### *2.2.1.1- Estudo das condições de acoplamento*

O estudo das condições de acoplamento da 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona à 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** foi iniciado usando como solvente o tolueno e como base o carbonato de sódio (Esquema 2.3). À solução de calcona em tolueno adicionou-se um excesso de base, seguido da adição de porfirina **1** (Esquema 2.3). A mistura reaccional foi mantida a refluxo durante 24 horas, ao fim das quais o controle por TLC mostrou que os reagentes de partida continuavam por reagir.

Numa segunda abordagem, resolveu-se substituir o solvente por DMF, mantendo a mesma base e modo de adição. Nestas condições, verificou-se a formação de vários compostos. No entanto, a análise das várias fracções isoladas por espectrometria de massa e por RMN de  $^1\text{H}$  levou-nos a concluir que não eram os compostos pretendidos.

A terceira tentativa para o acoplamento foi realizada em DMSO (Esquema 2.3). Neste caso, ao adicionar o excesso de base à 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona em DMSO, verificou-se alteração de cor da solução de amarelo para rosa (indicativa de formação do ião fenóxido). Em seguida, adicionou-se a porfirina **1** (2 equivalentes para 1 equivalente de calcona), e manteve-se a mistura reaccional a 50 °C. Ao fim de três horas verificou-se por TLC que praticamente 50% da porfirina **1** tinha sido convertida num composto novo, de cor rosa, mais polar. A mistura reaccional foi então lavada com água destilada, extraída com clorofórmio, a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro e, posteriormente, concentrada a pressão reduzida. De seguida, procedeu-se à separação por cromatografia em coluna de sílica gel, de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (secção 2.5.3.1). Após cristalização numa mistura de diclorometano/metanol, o produto maioritário foi obtido com um rendimento de 44%. A sua caracterização estrutural foi efectuada por RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{13}\text{C}$ ), espectrometria de massa ( $\text{FAB}^+$ ), UV-Vis e análise elementar. Os estudos efectuados estão de acordo com a estrutura proposta para o derivado **2**.



a) Tolueno, refluxo,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona, 24 horas; b) DMF, refluxo,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 24 horas; c) DMSO, 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50 °C, 3 horas; d) DMSO, 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 °C, 3 horas.

Esquema 2.3

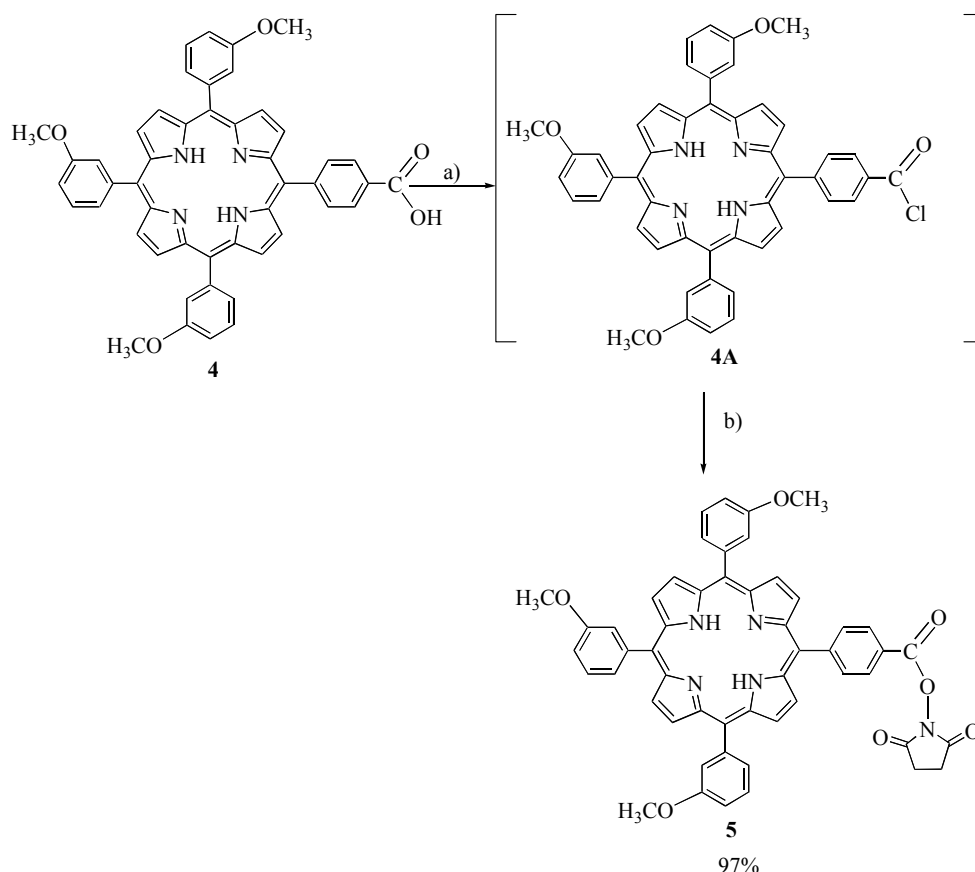
Tendo encontrado as condições experimentais para ligar a porfirimina **1** à 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona, propusemo-nos a sintetizar o derivado **3** (Esquema 2.3), resultante da reacção da porfirimina **1** com quatro moléculas de calcona.

Com o intuito de forçar a reacção para que ocorra a substituição regioselectiva de todos os átomos de flúor nas posições *para* dos quatro fenilos, usou-se um excesso de calcona (6 equivalentes) e aumentou-se a temperatura da reacção para 100 °C. De forma semelhante ao procedimento anterior, a adição da porfirina **1** à solução de calcona só foi efectuada após alteração da cor da solução. A reacção foi mantida sob agitação, atmosfera inerte e a 100 °C durante 3 horas, findas as quais se observou por TLC o consumo total do reagente de partida. Após arrefecimento, a mistura reaccional foi lavada com água, extraída com clorofórmio e a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro. De seguida procedeu-se à purificação da mistura reaccional recorrendo a técnicas de cromatografia de acordo com o descrito na parte experimental (secção 2.5.3.2). O produto maioritário da reacção foi caracterizado por RMN (<sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F e <sup>13</sup>C), espectrometria de massa (FAB<sup>+</sup>), espectroscopia de UV-Vis e análise elementar, e revelou tratar-se do derivado **3** pretendido. Após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo este derivado foi obtido com um rendimento de 33%.

#### **2.2.2- Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20- tris(3-metoxifenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona**

O acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona através de uma ligação éster envolveu uma metodologia sintética previamente estudada no nosso grupo para acoplar porfirinas com grupos carboxilo a açúcares e aminoácidos. Segundo esta metodologia, o grupo carboxilo foi activado com *N*-hidroxi-succinimida. Para tal, fez-se reagir a porfirina **4** com SOCl<sub>2</sub> em piridina seca tendo-se verificado por TLC, após 30 minutos de reacção à temperatura ambiente, a conversão total da porfirina de partida no cloreto de acilo correspondente (**4A**). Findo este período, adicionou-se a *N*-hidroxi-succinimida e colocou-se a mistura reaccional sob agitação a 50 °C. Ao fim de 3 horas observou-se, por TLC, a formação de um composto novo de cor rosa. Após arrefecimento, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e a mistura reaccional, após retomada em clorofórmio, foi lavada com uma solução básica saturada de hidrogenocarbonato de sódio, extraída com clorofórmio e seca através de sulfato de sódio anidro. De seguida, procedeu-se à purificação da mistura reaccional por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano como eluente.

Após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo, este produto de cor rosa, foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e EM (FAB $^+$ ) e revelou tratar-se do intermediário **5** pretendido (Esquema 2.4). Há ainda a referir que este composto foi obtido com um rendimento de 97%.



a)  $\text{SOCl}_2$ , piridina seca. b) *N*-hidroxi-succinimida, 50 °C.

Esquema 2.4

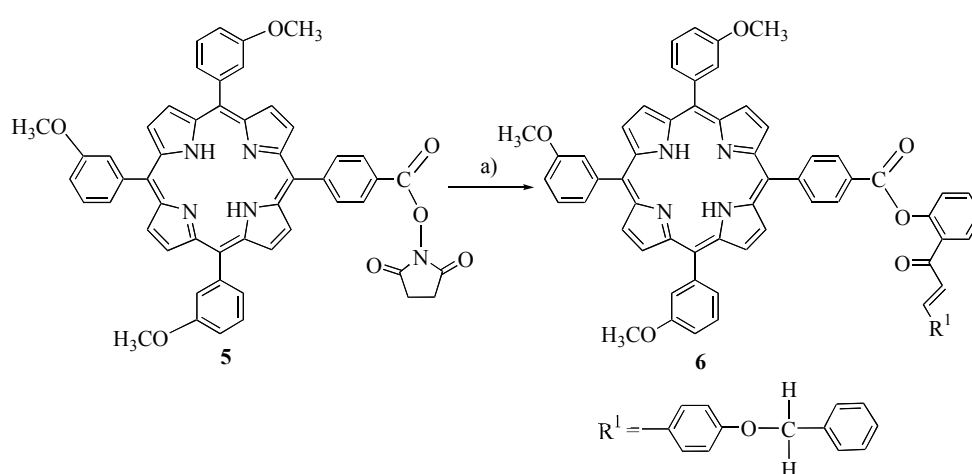
Uma vez sintetizado o éster activado **5**, procedeu-se ao seu acoplamento à referida calcona. Um dos factores essenciais para que a síntese ocorra com bons rendimentos é garantir que esta decorra em condições anidras. A presença de água no meio reaccional promove a hidrólise do éster originando o ácido de partida **4**.

Também aqui foram testadas várias condições experimentais para o acoplamento destas duas unidades estruturais (Esquema 2.5), encontrando-se os resultados obtidos compilados na Tabela 2.1.



Tabela 2.1- Condições experimentais testadas para a síntese do derivado **6**.

Solvente	Temperatura (°C)	Tempo de reacção (h)	Base	Rendimento (%)
Tolueno	50	5,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	91
THF	50	2,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	93
DMSO	ambiente	1,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	97



a) DMSO, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona, temperatura ambiente.

Esquema 2.5

Estes estudos foram iniciados em tolueno, na presença de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tendo-se verificado que só a 50 °C, a transformação ocorria de forma eficiente (91%). Na segunda experiência, quando se utilizou THF como solvente, a reacção foi mais rápida e o derivado **6** também foi obtido com óptimo rendimento. Na terceira experiência, onde usámos DMSO como solvente (Esquema 2.5), verificou-se que a reacção ocorre à temperatura ambiente e que ao fim de 1 h e 30 min a conversão foi praticamente total.

A diferença de reactividade observada nas diferentes condições experimentais poderá estar relacionada com a solubilidade do ião fenóxido em cada um dos solventes. De facto, logo após a adição de base à solução de 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona em DMSO à temperatura ambiente, verificou-se a rápida alteração de cor da solução de amarelo para rosa, o que não foi observado para as soluções da mesma calcona em tolueno e em THF. A

maior solubilidade do ião fenóxido e, consequentemente a sua maior disponibilidade no meio reaccional, facilita a reacção permitindo que esta ocorra rapidamente e em condições mais suaves (temperatura ambiente). As reacções foram terminadas mediante lavagem com água destilada, sendo a mistura reaccional extraída com clorofórmio. De seguida, a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida. A mistura reaccional foi então purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, com a finalidade de separar a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona adicionada em excesso do produto final da reacção - o derivado **6**.

O produto obtido, após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo, foi caracterizado com recurso a técnicas espectroscópicas de RMN monodimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensional (COSY, HSQC e HMBC), UV-Vis, EM (FAB<sup>+</sup>) e por análise elementar.

### **2.2.3 Caracterização estrutural dos derivados de tipo porfirina-calcona**

Como já foi referido, os compostos **2**, **3** e **6** foram identificados recorrendo a técnicas espectroscópicas de RMN, UV-Vis, EM (FAB<sup>+</sup>) e análise elementar. Nas secções seguintes, serão discutidos alguns aspectos fundamentais da caracterização estrutural de cada um, recorrendo a técnicas de RMN monodimensional ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), bidimensional (COSY, HSQC e HMBC) e, para o caso dos derivados fluorados **2** e **3**, a RMN de  $^{19}\text{F}$ .

#### *2.2.3.1- Derivados 2 e 3*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos derivados **2** e **3** apresentam características comuns dado que estes derivados apenas diferem no número de unidades de calcona acoplados à porfirina base **1** (Tabela 2.2). Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes dois derivados, a principal diferença reside nos sinais gerados pela ressonância dos prótons  $\beta$ -pirrólicos do núcleo porfirínico. No caso do derivado simétrico **3**, a ressonância dos prótons  $\beta$ -pirrólicos apresenta-se na forma de um singuleto a  $\delta$  8,95 ppm, enquanto que no caso do derivado **2** essas ressonâncias surgem sob a forma de um singuleto a  $\delta$  9,02 ppm e de dois dupletos a  $\delta$  9,00 ppm e 9,13 ppm.

Quanto aos desvios químicos e à multiplicidade dos sinais gerados pelo resíduo de calcona, estes são em tudo idênticos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos derivados **2** e **3**, como se pode ver mediante a análise da Tabela 2.2. Para facilitar a discussão espectroscópica, a identificação destes sinais é feita simultaneamente para os dois casos. Na figura 2.2 é apresentada a numeração atribuída ao esqueleto calcona.

Tabela 2.2- Desvios químicos ( $\delta$ , ppm, a partir do TMS) e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos derivados porfirínicos **2** e **3**.

	Derivado 2	Derivado 3
<b>H-3'</b>	7,34 (d)	7,31 (d)
<b>H-4'</b>	7,78-7,80 (m)	7,71-7,73 (m)
<b>H-5'</b>	7,49-7,51 (m)	7,45 (dt)
<b>H-6'</b>	7,80 (dd)	7,84 (dd)
<b>H-<math>\alpha</math></b>	7,43 (d)	7,40 (d)
<b>H-<math>\beta</math></b>	7,94 (d)	7,87 (d)
<b>H-2, H-6</b>	7,75 (d)	7,69 (d)
<b>H-3, H-5</b>	7,14 (d)	7,07 (d)
<b>CH<sub>2</sub> (grupo benziloxilo)</b>	5,21 (s)	5,14 (s)
<b>H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''</b>	7,36-7,44 (m)	7,33-7,42 (m)
<b>H-<math>\beta</math>-pirrólicos</b>	$\left\{ \begin{array}{l} 9,00(\text{d}) \\ 9,02 (\text{s}) \\ 9,13 (\text{d}) \end{array} \right.$	8,95 (s)

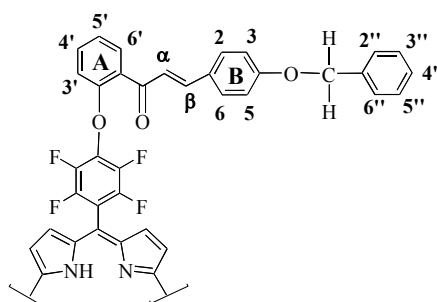


Figura 2.2- Numeração atribuída ao resíduo calcona para discussão dos espectros de RMN dos derivados **2**, **3** e **6**.

Pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos **2** e **3**, facilmente se distingue, na zona alifática, um singuleto atribuído à ressonância dos prótons  $\text{CH}_2$  do grupo benziloxilo da calcona, a  $\delta$  5,21 ppm e 5,14 ppm, respectivamente.

Quanto à zona aromática dos espectros, os sinais atribuídos à ressonância dos prótons do anel B da calcona são típicos de um sistema aromático *para* substituído e surgem como dois dupletos, a  $\delta$  7,75 ppm (H-2 e H-6;  $J= 8,8$  Hz) e 7,14 ppm (H-3, H-5;  $J= 8,8$  Hz), para o derivado **2** e a  $\delta$  7,79 ppm (H-2 e H-6;  $J= 8,8$  Hz) e 7,07 ppm (H-3, H-5;  $J= 8,8$  Hz) no caso do derivado **3**.

Por sua vez, os sinais gerados pela ressonância dos prótons do anel A são facilmente distinguíveis tendo em conta a sua multiplicidade e respectiva integração. Os sinais pela ressonância dos prótons H-6' e de H-4' surgem na forma de duplo duplete e de multiplete, respectivamente, e são os mais desprotegidos do anel A devido ao efeito desprotector do grupo carbonilo e, no caso de H-6', também devido ao efeito anisotrópico induzido pela dupla ligação. Da mesma forma, o multiplete gerado pela ressonância de H-4' surge a valores de frequência mais elevados do que H-3' e H-5'. Os sinais gerados pelos últimos, foram identificados como um duplete e como um multiplete (derivado **2**) ou como um duplete e um duplo triplete (derivado **3**), respectivamente.

Os estudos de correlação bidimensional ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , HMBC) efectuados permitiram a atribuição inequívoca dos sinais gerados pela ressonância de H- $\alpha$  e de H- $\beta$ , devido ao sinal de acoplamento verificado a  $^3J$  entre H- $\alpha$  e C-1 e entre H- $\beta$  e C-2 e C-6; estes sinais surgem na forma de dois dupletos com constantes de acoplamento típicas de uma configuração *trans* ( $J= 15,8$  e  $15,6$  Hz, para os derivados **2** e **3**, respectivamente) e confirmam, tal como esperado, que a configuração da dupla ligação da calcona permanece inalterada durante a reacção. A título de exemplo, apresenta-se a ampliação da zona do espectro de HMBC do derivado **3** que permitiu esta identificação (Figura 2.3).

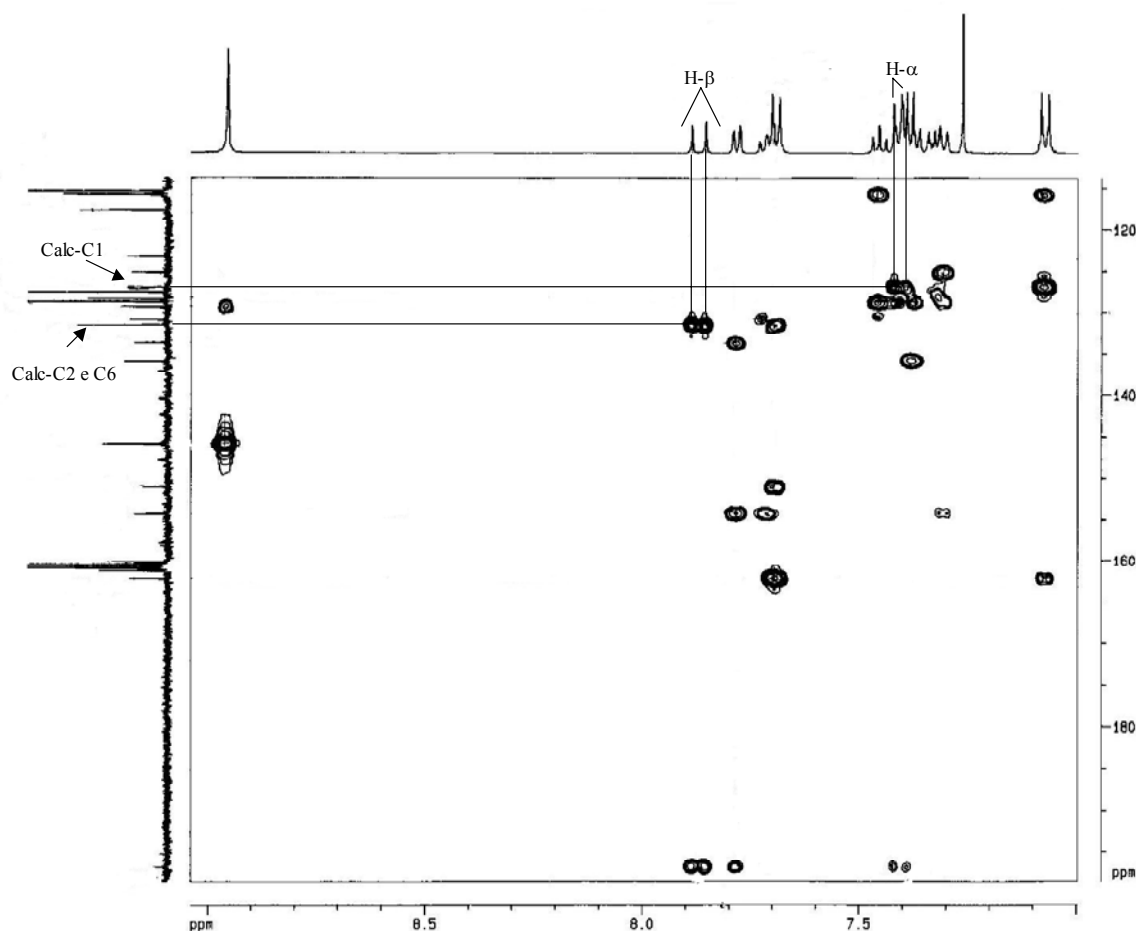


Figura 2.3- Ampliação de uma zona do espectro de HMBC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) do derivado **3**.

Relativamente aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos derivados **2** e **3**, destacam-se os sinais correspondentes à ressonância do carbono carbonílico a  $\delta$  196,7 ppm para o derivado **2** e a  $\delta$  196,8 ppm para o derivado **3**. Ainda há a salientar, em ambos os espectros, a presença de multipletos na região  $\delta$  115,6-148,6 ppm correspondentes à ressonância dos carbonos dos anéis aromáticos fluorados.

A ressonância magnética nuclear de  $^{19}\text{F}$  foi outra das técnicas analíticas usadas para a caracterização estrutural destes derivados. A alteração da integração dos sinais a par do aparecimento de novos sinais no espectro dos derivados mono- e tetra-substituídos (derivados **2** e **3**, respectivamente) face ao espectro da porfirina *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (porfirina **1**) mostram claramente a alteração de ambiente químico sentido e permitem concluir acerca do tipo de substituição (Figura 2.4).

O espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  da porfirina **1** (Figura 2.4 A), apresenta três conjuntos de sinais em zonas distintas, denunciando a presença de três grupos de átomos de flúor com ambientes químicos diferentes: o multiplete entre  $\delta$  -184,84 e -184,66 ppm é atribuído à ressonância dos átomos de fluor em posição *meta*; o tripleto a  $\delta$  -174,64 ppm é atribuído aos átomos de fluor em posição *para* e o multiplete entre  $\delta$  -160,6 e -160,0 ppm é atribuído à ressonância dos átomos de flúor em posição *orto*. A razão dos sinais é de 2:1:2, respectivamente.

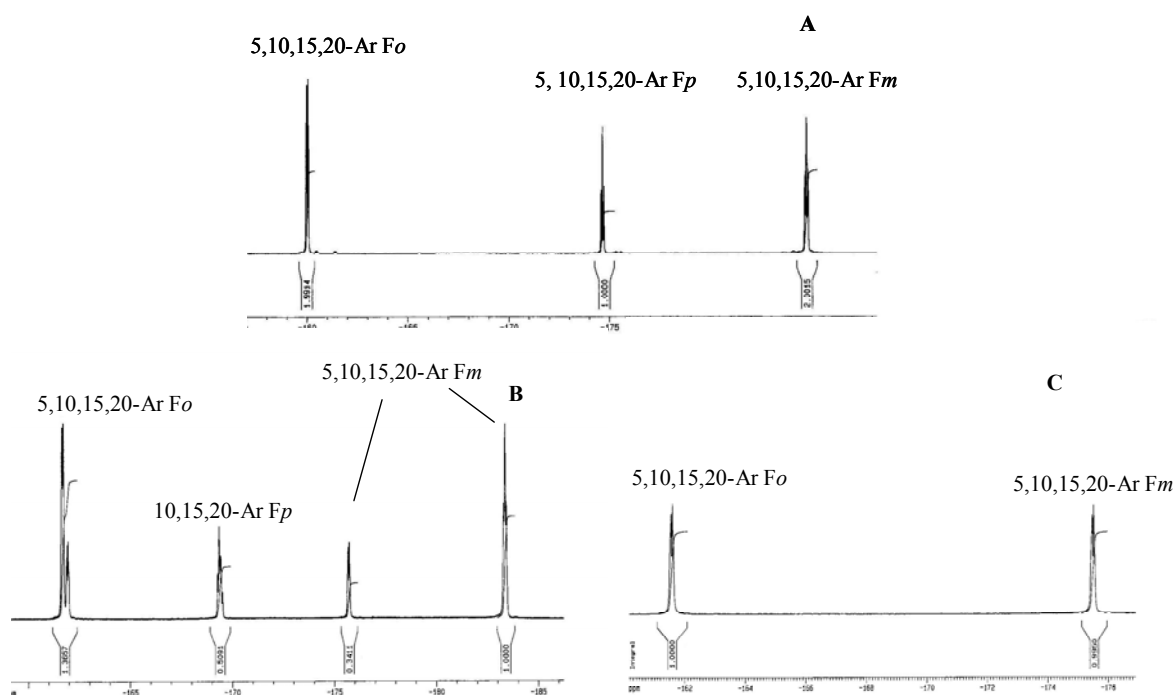


Figura 2.4- Espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  da porfirina **1** (A) e dos compostos resultantes do seu acoplamento a molécula(s) de 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona: porfirina **2** (B) e porfirina **3** (C).

Relativamente ao derivado **2** (Figura 2.4B), destaca-se o desdobramento dos sinais dos átomos de flúor: os sinais gerados pela ressonância dos átomos de flúor em *meta* surgem na forma de um multiplete de  $\delta$  -183,41 a -183,30 ppm e de um duplete a  $\delta$  -175,70 ppm ( $J=11,3$  Hz), segundo uma razão de integrais de 1:3, respectivamente. Os sinais dos átomos de flúor *meta* do fenilo substituído surgem a desvios químicos superiores. Por sua vez, o sinal gerado pela ressonância dos átomos de flúor em *orto* surgem como dois dupletos a  $\delta$  -161,9 ppm ( $J=14,1$  Hz) e a  $\delta$  -161,6 ppm ( $J=14,1$  Hz) sendo a razão de integrais de 1:3, respectivamente. Neste caso, o duplete mais desprotegido corresponde aos gerados pela ressonância dos átomos de flúor do fenilo não substituído. O multiplete de  $\delta$  -168,8 ppm a -168,6 ppm é devido à ressonância dos átomos

de flúor em *para*. A integração do sinal para três átomos de flúor permite concluir de forma inequívoca a ocorrência da substituição de um dos átomos de flúor em *para* da porfirina base.

O espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  do derivado **3** (Figura 2.4 C) é mais simples do que o caso anterior: é definido por dois dupletos a  $\delta$  -175,5 ppm ( $J= 14.1$  Hz) e a  $\delta$  -161,6 ppm ( $J= 14,1$  Hz) com uma razão de integrais 1:1, atribuídos à ressonância dos átomos de flúor em *meta* e em *orto*, respectivamente. A ausência do sinal gerado pelos átomos de flúor em *para* é indicativa da substituição da totalidade dos átomos de flúor dessa posição.

#### 2.2.3.2- Derivado **6**

No que respeita à caracterização estrutural do derivado **6**, resultante do acoplamento de uma molécula de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina **4** a uma molécula da mesma calcona, a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é bastante mais complexa (Figura 2.5), devido à sobreposição dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons do esqueleto da calcona com os sinais gerados pela ressonância dos prótons do núcleo porfirínico.

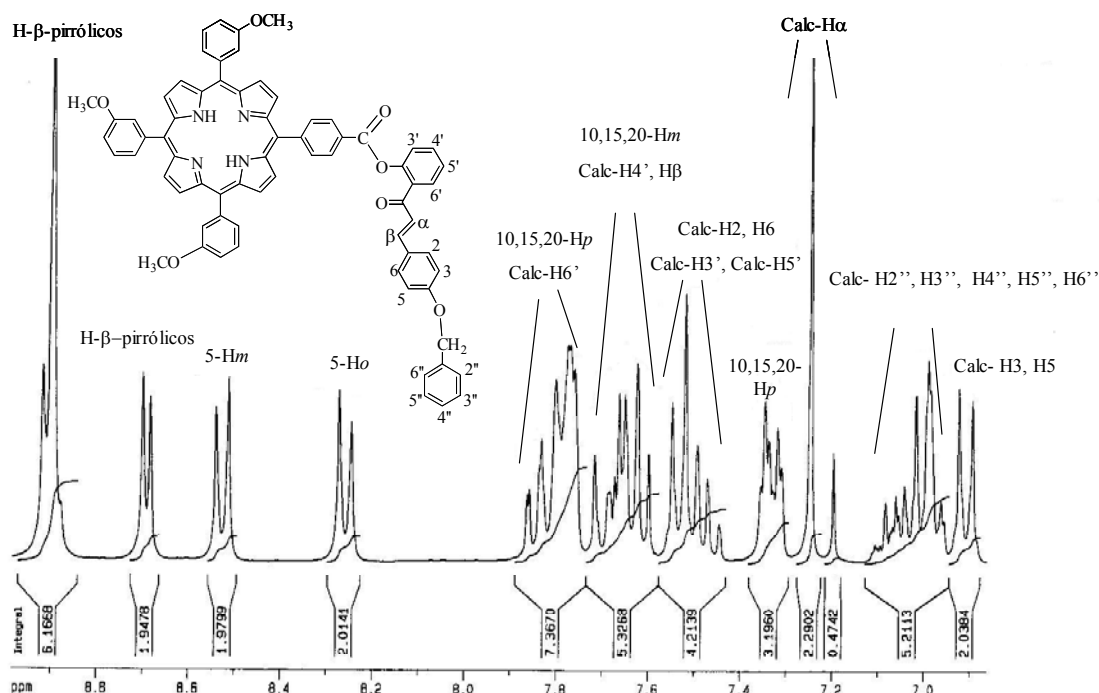


Figura 2.5- Ampliação da zona aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **6**.



A atribuição dos sinais foi possível apenas com recurso a técnicas de espectroscopia de ressonância magnética bidimensional (COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ), HSQC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) e HMBC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ )).

Na zona alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deste derivado, distinguem-se facilmente os sinais gerados pela ressonância dos prótons do grupo metoxilo em *meta* dos fenilos, sob a forma de dois singletos a  $\delta$  3,97 ppm e 3,99 ppm. A  $\delta$  4,79 ppm surge um outro singlete correspondente à ressonância dos prótons alifáticos do grupo benziloxilo da calcona.

Relativamente à zona aromática do mesmo espectro, a  $\delta$  6,92 ppm distingue-se o duplete ( $J= 8,8$  Hz) mais protegido que foi atribuído à ressonância dos prótons H-3 e H-5. No espectro de COSY verifica-se acoplamento entre este sinal e um duplete inserido no multiplete a  $\delta$  7,48-7,56 ppm que permitiu a atribuição inequívoca do sinal gerado pela ressonância de H-2 e H-6 (Figura 2.5).

Por outro lado, a ressonância dos prótons aromáticos do grupo benziloxilo surge no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **6** sob a forma de um multiplete a  $\delta$  6,97-7,09 ppm. O espectro de HMBC permitiu, a partir do acoplamento verificado pelo carbono alifático do grupo benziloxilo com os prótons aromáticos do mesmo grupo substituinte, a atribuição do multiplete correspondente à ressonância dos mesmos.

O sinal de H-6' é atribuído com base no acoplamento verificado no espectro de HMBC com o carbono carbonílico da calcona, como estando compreendido no intervalo de desvio químico abrangido pelo multiplete a  $\delta$  7,75-7,86 ppm. O sinal atribuído à ressonância de H-4' encontra-se no multiplete a  $\delta$  7,60-7,71 ppm.

Relativamente aos sinais gerados pela ressonância dos prótons *para*, *meta* e *orto* dos anéis aromáticos 10, 15 e 20 do macrociclo porfirínico, estes surgem como multipletos nas regiões do espectro de RMN compreendidos entre  $\delta$  7,31-7,35 ppm,  $\delta$  7,60-7,71 ppm e  $\delta$  7,76-7,86 ppm, respectivamente.

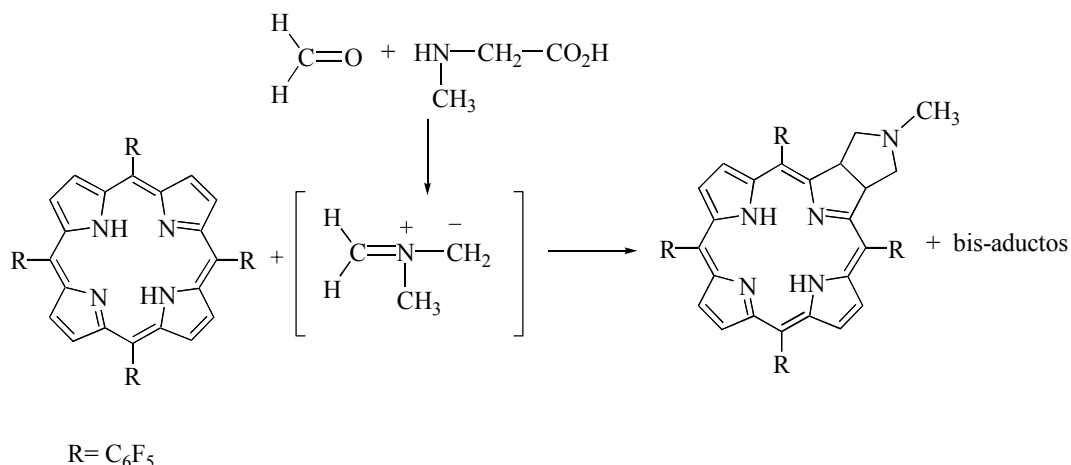
### **2.3- Porphirinas como dipolarófilos em reacções de cicloadição 1,3-dipolar**

Ao longo dos últimos anos, o grupo de investigação de Aveiro e outros têm demonstrado que porfirinas adequadamente substituídas podem participar em reacções de cicloadição como dienos, dienófilos, 1,3-dipolos e dipolarófilos.<sup>11,23-33</sup> Estas reacções de

cicloadição são consideradas alternativas eficientes às reacções com tetra-óxido de ósmio<sup>34</sup> e com di-imina<sup>35</sup> para a preparação de clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas.

No caso particular de reacções 1,3-dipolar, a reactividade de *meso*-tetra-arilporfirinas como dipolarófilos com iletos de azometino, nitronas e diazometano foi iniciada por Cavaleiro *et al.* Estes estudos revelaram que macrociclos porfirínicos com grupos sacadores de electrões são os mais reactivos como dipolarófilos, conduzindo muitas vezes à formação não só de mono-aductos como também de bis-aductos.

Os iletos de azometino, reagem com *meso*-tetra-arilporfirinas em reacções de cicloadição 1,3-dipolar conduzindo preferencialmente à formação de clorinas (Esquema 2.6).<sup>27,28</sup> Os estudos realizados demonstraram que o bis-aducto formado em maior quantidade é uma isobacterioclorina com configuração *trans* (Figura 2.6).



Esquema 2.6

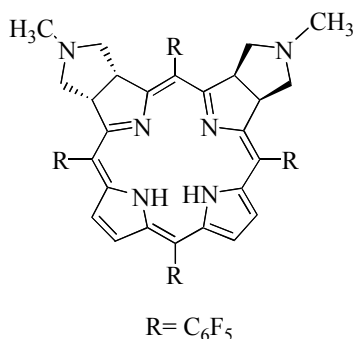
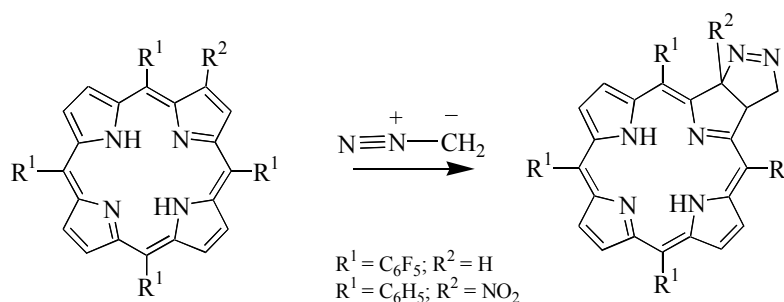


Figura 2.6-Principal produto de bis-adição resultante da reacção da clorina com ileto de azometino.

Também no caso em que usaram nitronas como dipolarófilos foi observada a formação do mono-aducto correspondente como produto maioritário da reacção.

Derivados de tipo pirazoloporfirina foram obtidos como produtos maioritários em reacções 1,3-dipolar de tetra-arilporfirinas com grupos sacadores de electrões como a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina e a 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirina com diazometano (Esquema 2.7).<sup>31,32</sup> Neste tipo de reacções não ocorreu a formação de bis-aductos.



Esquema 2.7

Mais recentemente, Dolphin e colaboradores estudaram a preparação de clorinas a partir da reacção de porfirinas com iletos de carbonilo<sup>30</sup> e verificaram também que grupos sacadores de electrões aumentam a reactividade do macrociclo porfirínico como dipolarófilo. No entanto, quando o 1,3-dipolo apresenta grupos sacadores de electrões, a reactividade na presença do macrociclo porfirínico com grupos sacadores de electrões é substancialmente inferior.

Zhu *et al.*,<sup>33</sup> referiram a síntese de clorinas como produtos maioritários da reacção de cicloadição 1,3-dipolar entre porfirinas e óxido de 2,6-diclorobenzonitrilo (Figura 2.7).

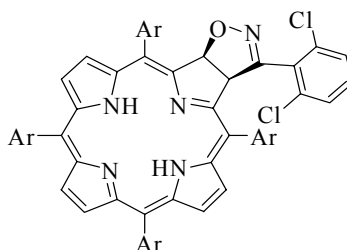


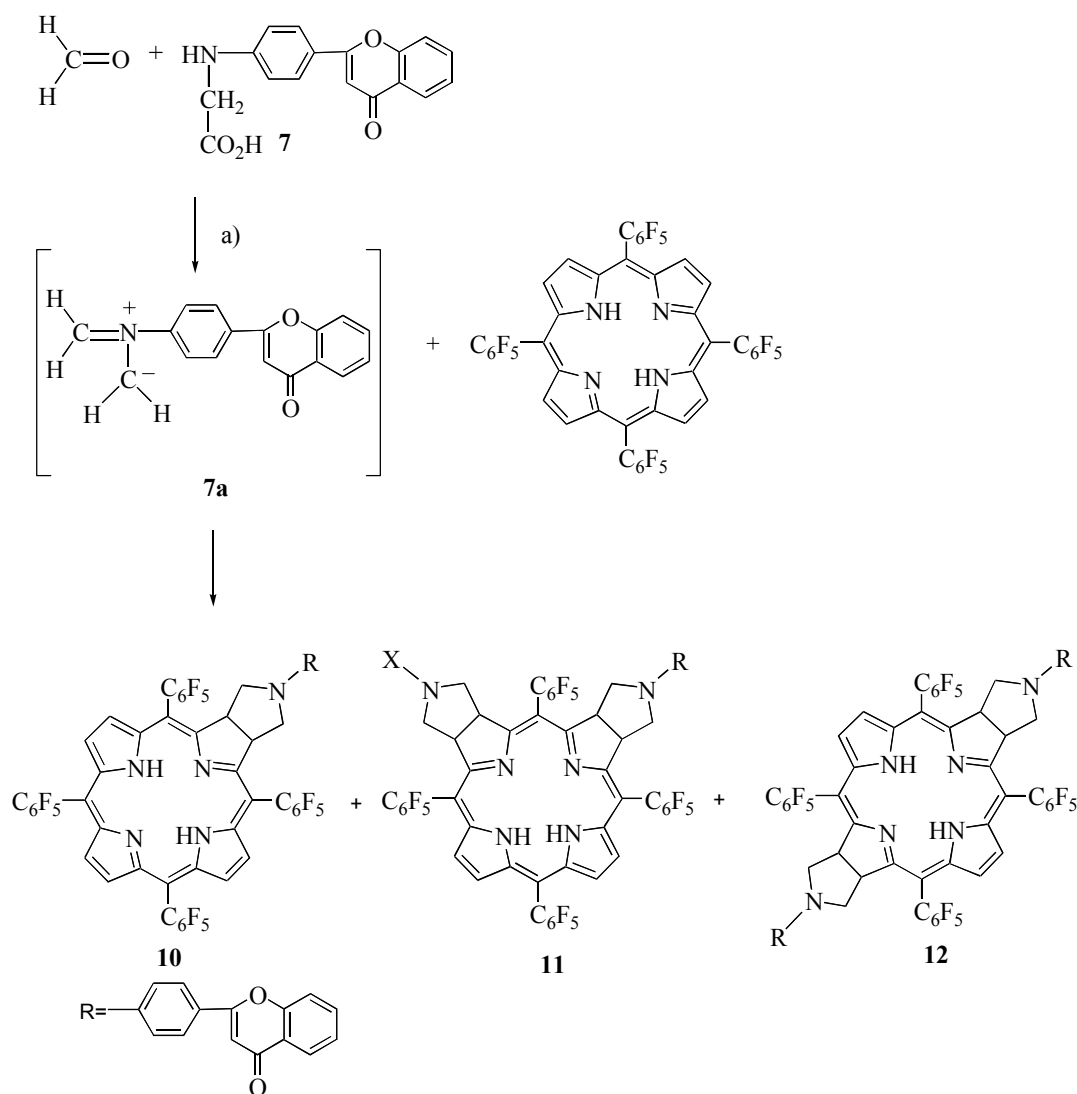
Figura 2.7

Mais uma vez foi verificado que a reactividade é superior quando se usam macrociclos porfirínicos substituídos com grupos sacadores de electrões como dipolarófilos. Porém, quando o mesmo tipo de reacção foi efectuado usando como dipolarófilo o complexo de zinco da mesma porfirina, o único produto formado foi a clorina correspondente, pelo que concluíram que a reactividade destes macrociclos é superior quando estes se apresentam na forma livre.

### **2.3.1- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** a derivados de *N*-flavonilglicina.**

Estudos anteriormente desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação, relativos à reactividade de porfirinas e iletos de azometino em reacções de cicloadição 1,3-dipolar, levaram-nos a seleccionar a porfirina **1**, com grupos sacadores de electrões, para o estudo da reactividade de iletos de azometino derivados de *N*-flavonilglicina (*N*-(4-flavonil)glicina **7**, *N*-(3-flavonil)glicina **8** e *N*-(2-flavonil)glicina **9**) como dipolos. Vários são os procedimentos descritos na literatura, para a síntese de iletos de azometino, como por exemplo, a termólise ou fotólise de aziridinas,<sup>34, 35</sup> a remoção de um protão de haletos de derivados de piridínio com uma base<sup>36</sup> e aquecimento de compostos de carbonilo com  $\alpha$ -aminoácidos.<sup>37</sup> Este último, apresenta algumas vantagens associadas ao facto de ocorrer em condições neutras, possibilitando o uso de uma grande variedade de dipolarófilos.

Estas reacções de acoplamento foram iniciadas pela adição de paraformaldeído e de *N*-(4-flavonilglicina) **7** a uma solução de porfirina **1** em tolueno, a refluxo. Pretende-se com este procedimento promover o ataque do grupo amino da *N*-flavonilglicina **7** ao composto de carbonilo, com formação da imina correspondente que, por descarboxilação, origina o ileto de azometino reactivo **7a** (Esquema 2.8). Desta forma, este é gerado *in situ* na presença do respectivo dipolarófilo, minimizando assim os problemas associados à conhecida instabilidade destes 1,3-dipolos.



a) Tolueno, refluxo, 16 horas.

Esquema 2.8

A reacção foi mantida em refluxo, sob atmosfera de azoto e protegida da luz. Ao fim de 5 horas observou-se, por TLC, a formação de uma pequena quantidade de um novo composto, mais polar, de cor verde. Com o intuito de forçar a reacção, foram feitas duas adições de paraformaldeído e de *N*-(4-flavonil)glicina **7**, em iguais períodos de cinco horas. Findas 16 horas, a monitorização da reacção por TLC revelou que a quantidade de composto verde não aumentava e que se começava a formar um composto de cor rosa, também mais polar, pelo que se deu por terminada a reacção. O solvente foi então evaporado a pressão reduzida, e o resíduo foi retomado em clorofórmio e posteriormente lavado com água. A fase orgânica, depois de seca através de sulfato de sódio anidro, foi

concentrada e separada por cromatografia de coluna de sílica gel. Em resultado dessa cromatografia, foram recolhidas duas fracções usando como eluente um mistura de éter de petróleo/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1): a primeira, de cor rosa, foi identificada por TLC como sendo constituída pela porfirina de partida **1** que não reagiu (30 %) e a segunda, de cor verde, foi identificada posteriormente por UV-Vis, RMN e EM ( $\text{FAB}^+$ ) (secção 2.3.1.1) como sendo a clorina **10** (57%). A terceira fracção, de cor rosa, foi recolhida aumentando a polaridade do eluente para uma mistura de éter de petróleo/ diclorometano (1:2). Esta terceira fracção é constituída por dois compostos de cor rosa que foram separados por TLC preparativa usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluente. Dada a pequena quantidade obtida de cada um deles, estes foram apenas identificados por EM ( $\text{FAB}^+$ ) e por UV-Vis. Ambos os espectros de massa revelaram a presença de um ião mais abundante a  $m/z$  1502, característico de um composto resultante da adição de duas moléculas de 1,3-dipolo à porfirina **1** (Esquema 2.8). No entanto, a análise do espectro de UV-Vis de cada uma destas fracções permitiu concluir que o bis-aducto mais abundante é a isobacterioclorina **11**, enquanto que composto menos abundante é a bacterioclorina **12**; espera-se futuramente realizar mais estudos que possibilitem a identificação da configuração *cis* ou *trans* dos bis-aductos (Figura 2.8) obtidos.

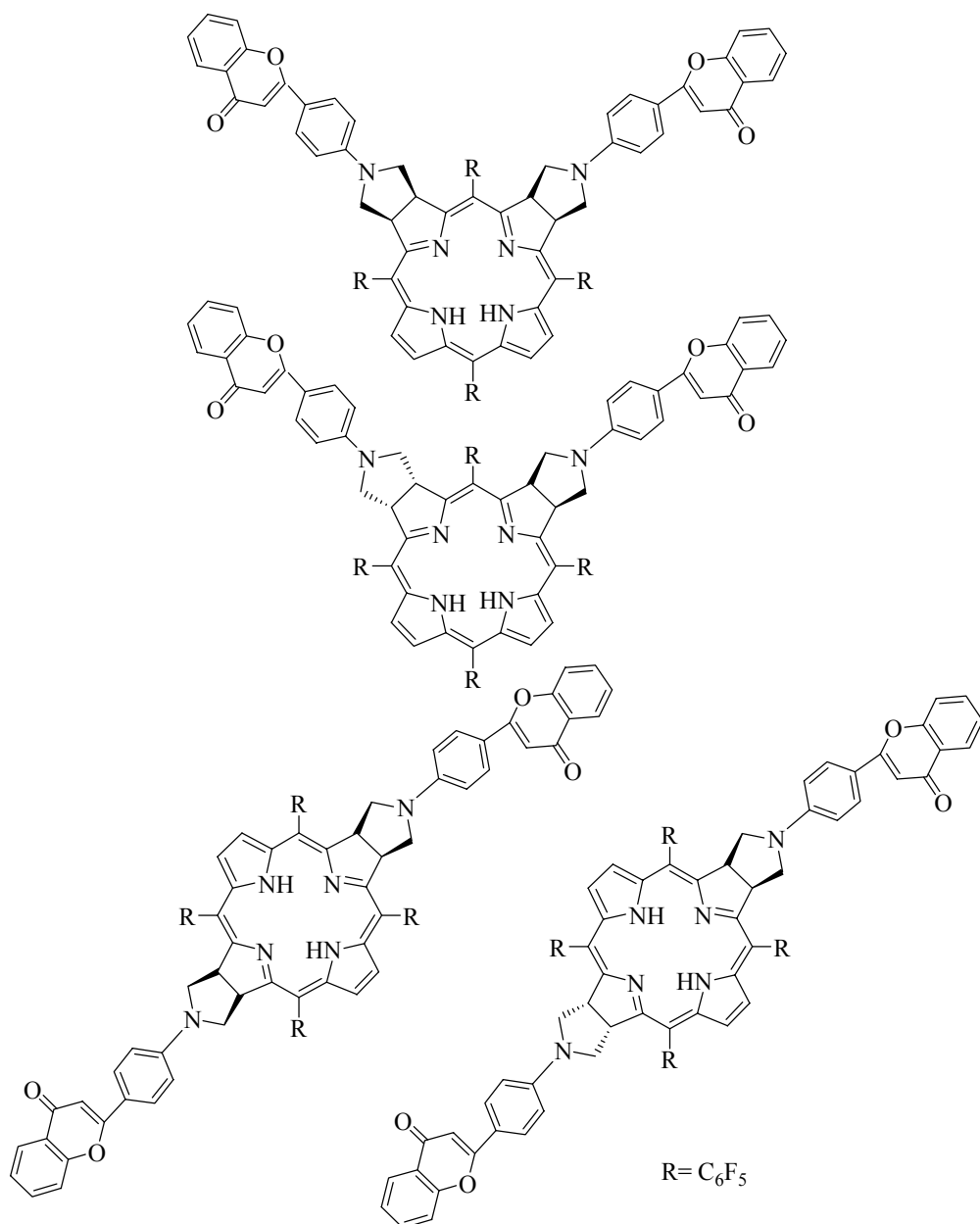
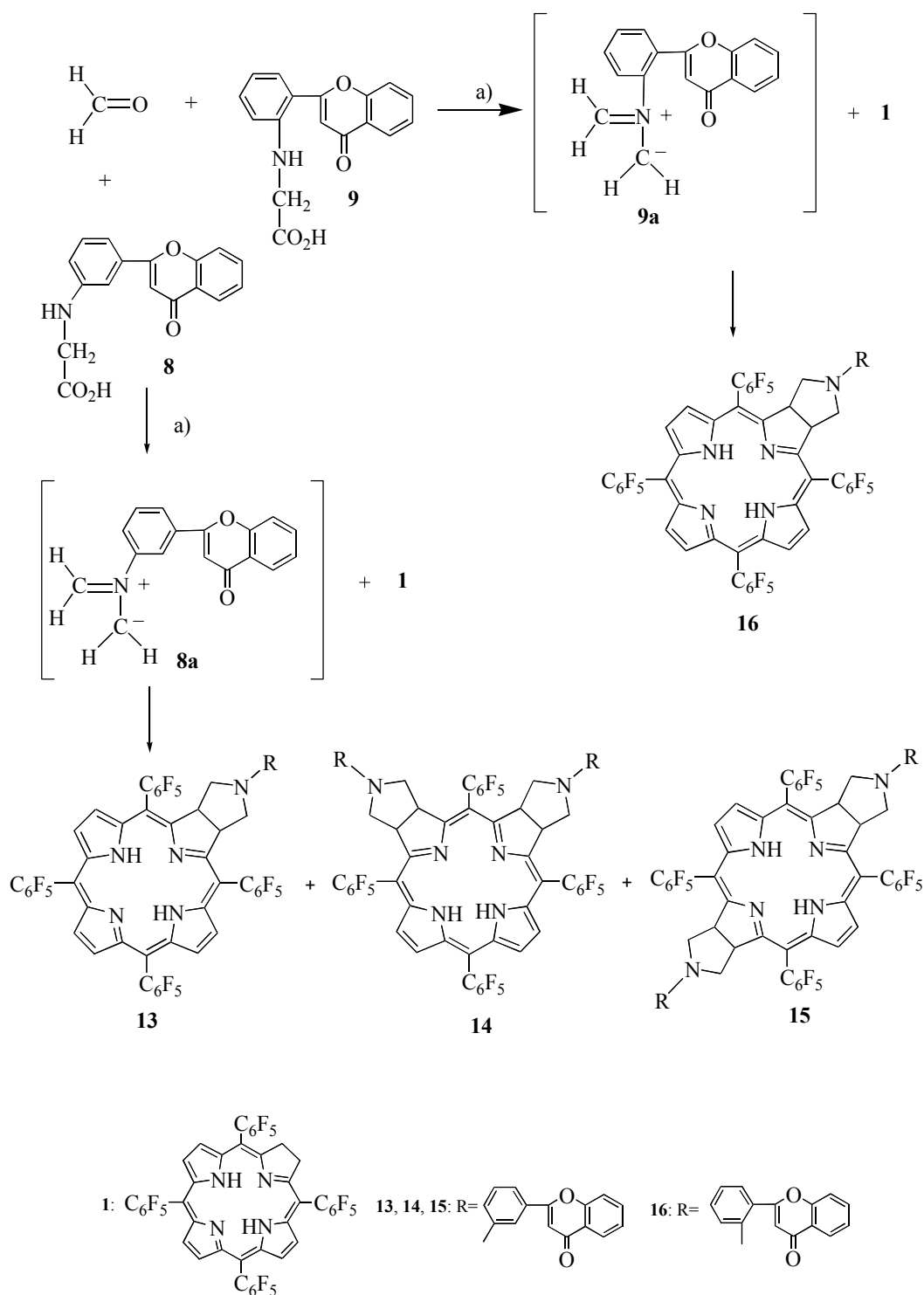


Figura 2.8- Possíveis estruturas dos bis-aductos, de tipo isobacteriocloration e bacteriocloration, obtidos na reacção de acoplamento da porfirina **1** ao ileto de azometino **7a**.

O acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** aos derivados *N*-(3-flavonil)glicina **8** e *N*-(2-flavonil)glicina **9** foi efectuado de acordo com o procedimento experimental descrito anteriormente. Seguindo esta metodologia, verificou-se, em ambos os casos, a formação da clorina correspondente **13** e **16**, respectivamente, como produto maioritário da reacção (Esquema 2.9). A caracterização estrutural destes derivados foi efectuada por UV-Vis, EM (FAB<sup>+</sup>), e diversas técnicas de RMN mono- e bi-dimensional como RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, COSY, HSQC e HMBC e encontra-se descrita na

secção 2.3.1.1. No entanto, quando a reacção ocorreu com a *N*-(3-flavonil)glicina **8** obtiveram-se ainda mais dois derivados que, devido à pequena quantidade isolada, apenas foram analisados por EM (FAB<sup>+</sup>) e UV-Vis. Neste caso, também ambos os espectros de massa apresentam como íão mais abundante o íão a *m/z* 1502, característico da formação de bis-aductos. Mais uma vez, procedendo à análise dos espectros de UV-Vis de cada uma destas duas fracções, é possível verificar que o bis-aducto mais abundante neste tipo de reacções corresponde à isobacterioclorina **14**, e o menos abundante corresponde à bacterioclorina **15** (Esquema 2.9). Também neste caso, serão realizados mais estudos que possibilitem a identificação da configuração *cis* ou *trans* dos bis-aductos.





Esquema 2.9- a) Tolueno, refluxo, 16 horas.

Na Tabela 2.3 são apresentados os rendimentos com que foram obtidos os diferentes aductos, assim como a percentagem de porfirina de partida **1** recuperada em cada um dos casos.

Tabela 2.3- Rendimentos obtidos nas reacções da porfirina **1** com os derivados de *N*-flavonilglicina **7**, **8** e **9**.

<i>N</i> -flavonilglicina	Monoadducto (%)	Bis-adducto	Porfirina <b>1</b> (% recuperada)
<b>7</b>	57	Observado	30
<b>8</b>	53	Observado	35
<b>9</b>	22	Não observado	71

Pela análise dos resultados da Tabela 2.3 é possível verificar que, face à porfirina **1**, a reactividade do ileto de azometino obtido a partir da reacção da *N*-(2-flavonil)glicina **9** com paraformaldeído é significativamente inferior à reactividade dos iletos de azometino derivados da *N*-(4-flavonil)glicina **7** e da *N*-(3-flavonil)glicina **8**. De facto, nas mesmas condições reacionais, além de não se verificar a formação de produtos resultantes da bis-adição, a quantidade de porfirina de partida **1** recuperada é bastante superior e, consequentemente, o rendimento de formação da clorina correspondente é significativamente inferior.

#### *2.3.1.1- Caracterização estrutural dos derivados de tipo porfirina-flavona*

De acordo com o mencionado anteriormente, os derivados **10**, **13** e **16** foram caracterizados por RMN, EM (FAB)<sup>+</sup> e UV-Vis. No que respeita aos derivados **11**, **12**, **14** e **15**, a sua identificação foi efectuada recorrendo a EM (FAB<sup>+</sup>) e a UV-Vis. Nesta secção serão apresentados e discutidos os aspectos estruturais mais relevantes destes derivados.

##### *2.3.1.1.1- Caracterização por UV-Vis dos derivados **10**, **13** e **16***

A primeira evidência da formação de macrociclos de tipo clorina surge mediante a análise dos seus espectros de UV-Vis com o aparecimento de uma banda de absorção intensa na região dos 650 nm, típica deste tipo de núcleos (Figura 2.9).

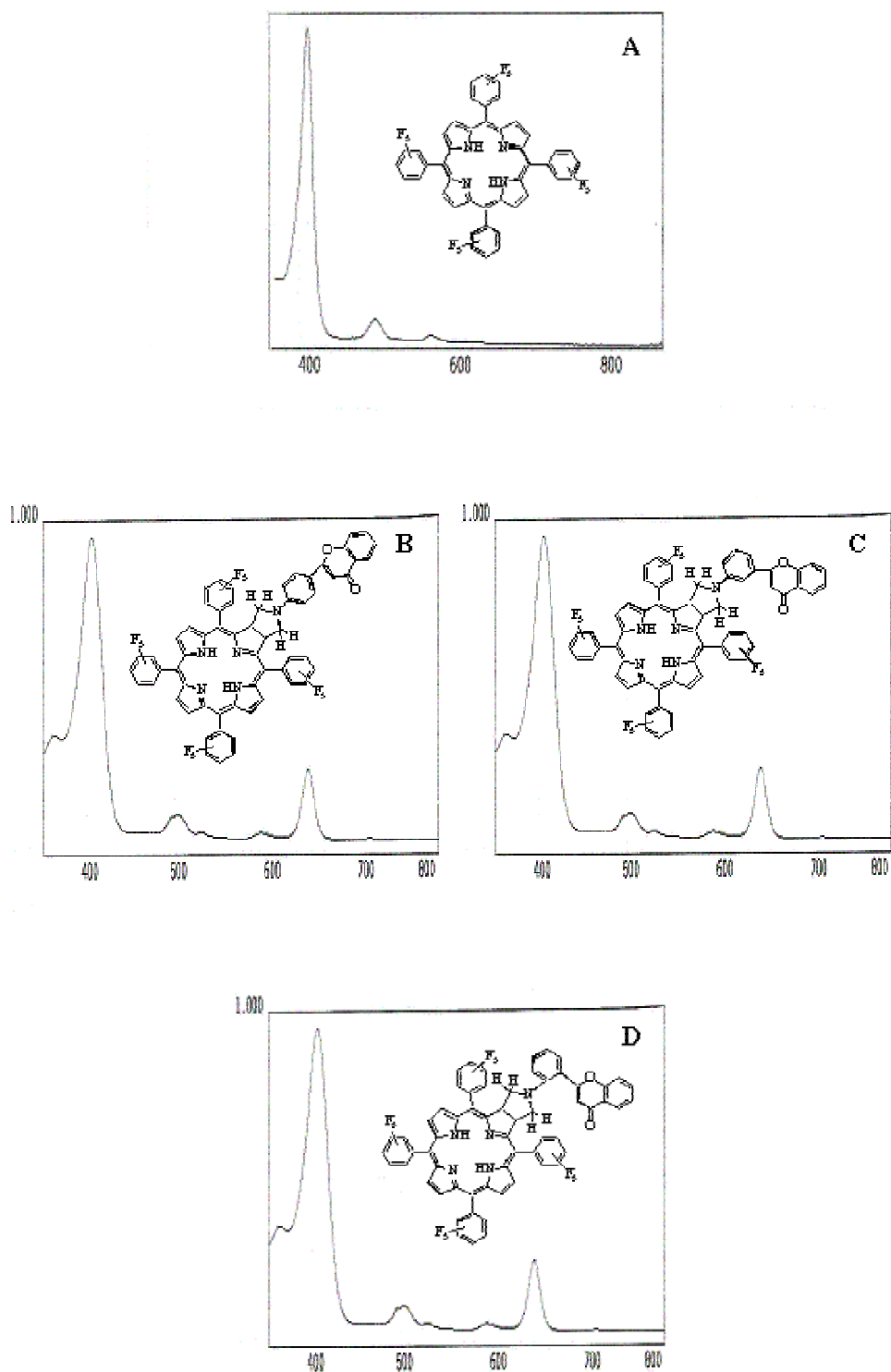


Figura 2.9- Espectros de UV-Vis em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (A)- porfirina de partida 1; (B)- clorina 10; (C)-clorina 13 e (D)-clorina 16.

### 2.3.1.1.2- Caracterização por RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{19}\text{F}$ das clorinas **10**, **13** e **16**

Também os diferentes estudos de RMN efectuados são concordantes com a estrutura proposta para os novos derivados sintetizados. Iniciando a discussão destes resultados pela análise da zona de ressonância típica dos protões  $\beta$ -pirrólicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da clorina **10**, facilmente concluímos pela multiplicidade e integração encontradas que estamos na presença de um macrociclo reduzido de tipo clorina. Dado o plano de simetria da molécula, os sinais devidos à ressonância dos protões  $\beta$ -pirrólicos surgem sob a forma de dois dupletos a  $\delta$  8,43 ppm ( $J= 4,9$  Hz) e a  $\delta$  8,74 ppm ( $J= 4,9$  Hz), gerados pela ressonância dos protões H-7, H-18 e H-8, H-17 e um singuleto a  $\delta$  8,49 ppm gerado pela ressonância dos protões equivalentes H-12 e H-13 (Figura 2.10).

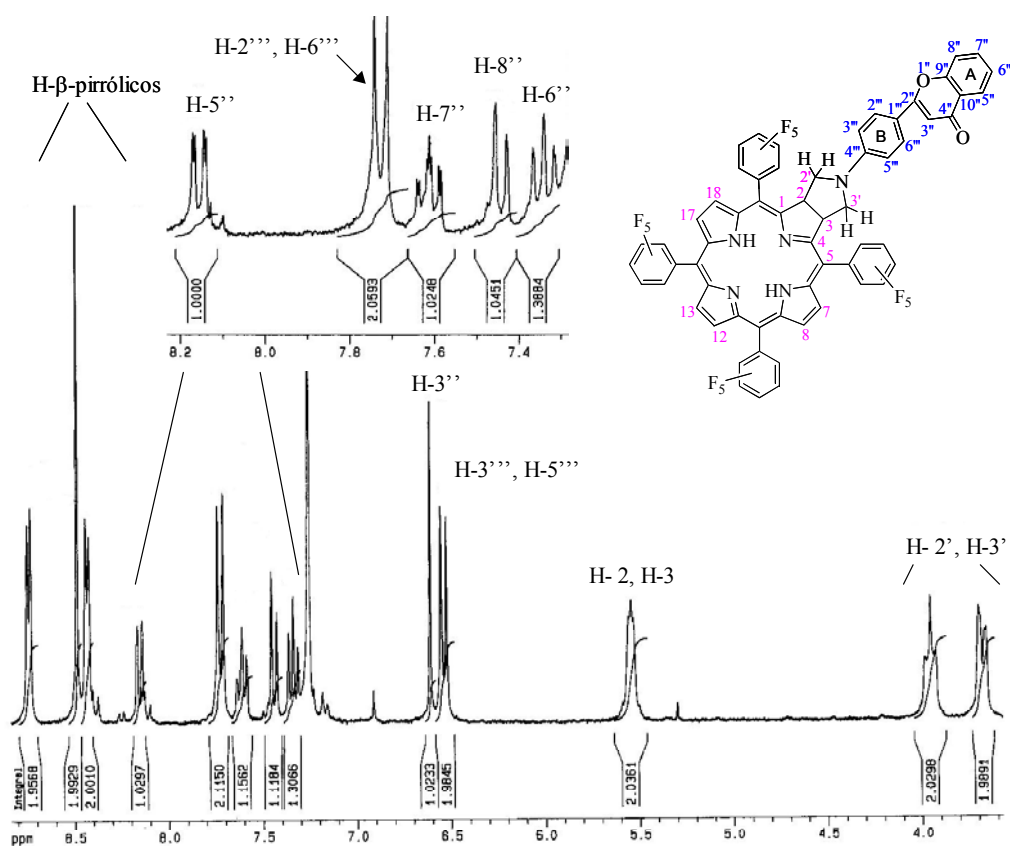


Figura 2.10- Ampliação de parte do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da clorina **10**.

Por outro lado, a presença do anel de pirrolidina como via de acoplamento entre a unidade porfirínica e a flavona é também facilmente comprovada pela análise da zona

alifática do mesmo espectro, devido à presença de três multipletos entre  $\delta$  3,66-3,70 ppm,  $\delta$  3,93-4,00 ppm e  $\delta$  5,53-5,56 ppm, segundo uma razão de integrais de 1:1:1. A análise detalhada do espectro de HSQC (Figura 2.11) foi particularmente útil na atribuição desses sinais; a correlação existente entre os dois multipletos mais protegidos e apenas um sinal de carbono, permite atribuir cada um destes sinais à ressonância dos prótons equivalentes H-2' e H-3'. Assim, o sinal gerado pela ressonância dos prótons H-2 e H-3 das posições  $\beta$ -saturadas da clorina é o multipeto a  $\delta$  5,53-5,56 ppm.

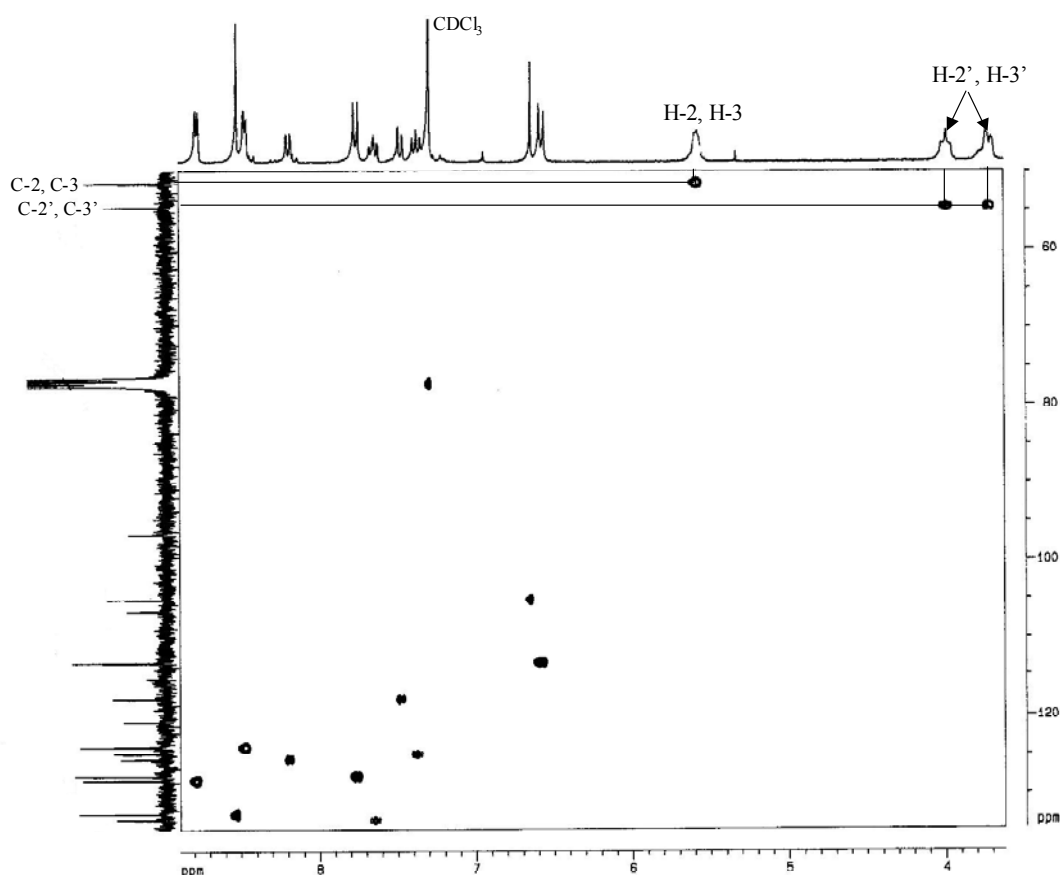


Figura 2.11- Ampliação de uma zona do espectro de HSQC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da clorina **10**.

Os sinais gerados pela ressonância dos prótons do anel A da flavona são facilmente identificados por surgirem com multiplicidade e a gamas de frequência características. Assim, identifica-se a  $\delta$  8,15 ppm um duplo duplete gerado pela ressonância de H-5'' ( $J=1,5$  Hz e  $J=8,1$  Hz), a  $\delta$  7,61 ppm um duplo triplete gerado pela ressonância de H-7''

( $J = 1,5$  Hz e  $J = 8,1$  Hz), a  $\delta$  7,44 ppm um duplete gerado pela ressonância de H-8'' ( $J = 8,1$  Hz) e a  $\delta$  7,34 ppm um triplete gerado pela ressonância de H-6'' ( $J = 8,1$  Hz).

Estas atribuições foram também comprovadas pela análise detalhada do espectro de COSY (Figura 2.12).

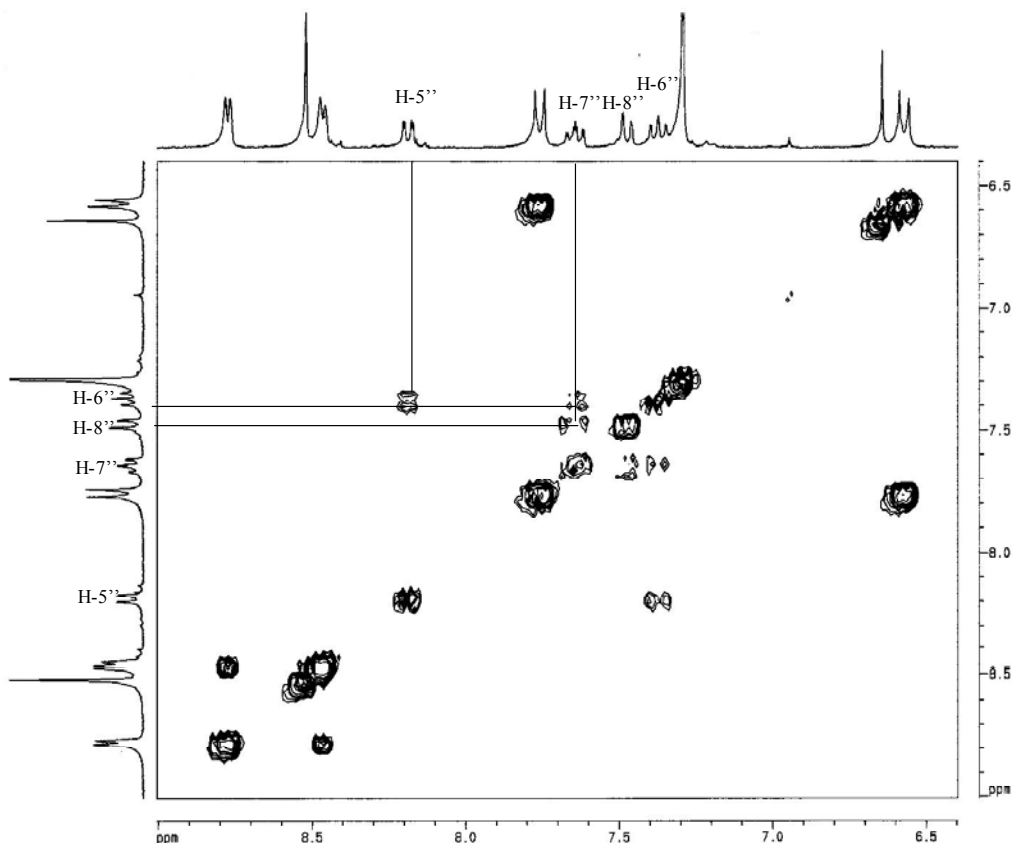


Figura 2.12- Ampliação da zona aromática do espectro de COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) da clorina 10.

Quanto aos sinais gerados pela ressonância dos prótons do anel B da flavona, estes surgem a desvios químicos e com multiplicidades características de um anel aromático *para* substituído; surgem dois sinais em forma de dois dupletos ( $J = 8,9$  Hz), a  $\delta$  6,54 ppm e a  $\delta$  7,73 ppm. O duplete mais desprotegido é atribuído à ressonância dos prótons H-2''' e H-6'''. Esta atribuição foi também comprovada pela análise do espectro de HMBC, devido aos sinais de acoplamento observados entre o sinal de C-1''' e o sinal de H-3''' e H-5''' e entre o sinal de C-2'' e H6''', H-2'''.

Em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da clorina **10**, há ainda a salientar o singuleto a  $\delta$  6,61 ppm gerado pela ressonância de H-3''.

Relativamente ao espectro de  $^{13}\text{C}$ , o acoplamento de uma molécula de flavona é comprovado pela presença do sinal atribuído ao carbono do grupo carbonilo do anel C da flavona (C-4'') a  $\delta$  178,3 ppm.

Também no caso dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das clorinas **13** e **16** (Figura 2.13 e Tabela 2.4) é possível identificar facilmente alguns dos sinais do esqueleto flavona acoplado. À semelhança do composto anterior, o assinalamento da ressonância dos prótons do anel A da flavona (H-5'' e 8''), foi conseguido graças à análise dos espectros de RMN de COSY. Ainda em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da clorina **13**, salienta-se o sinal na forma de duplo duplete a  $\delta$  6,64 ppm gerado pela ressonância de H-3''' e o multiplete a  $\delta$  7,10-7,28 ppm gerado pela ressonância dos prótons H-2''', H-4''' e H-6'''.

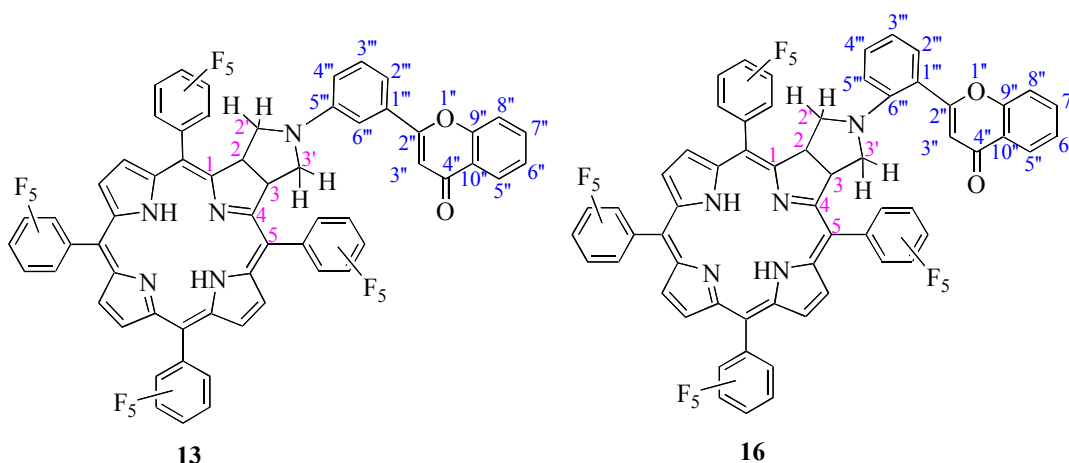


Figura 2.13- Numeração atribuída às clorinas **13** e **16** para interpretação dos respectivos espectros de RMN.

Tabela 2.4- Desvios químicos ( $\delta$ , ppm, a partir do TMS) e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das clorinas **10**, **13** e **16**.

	H- $\beta$ -pirrólicos ( $\delta$ ppm)	H- $\beta$ -saturadas ( $\delta$ ppm)	H-pirrolidina ( $\delta$ ppm)	H-5'' ( $\delta$ ppm)	H-6'' ( $\delta$ ppm)	H-7'' ( $\delta$ ppm)	H-8'' ( $\delta$ ppm)	NH internos
<b>10</b>	d (8,43) s (8,49) d (8,74)	m (5,53-5,56)	m (3,66-3,70) m (3,93-4,00)	dd (8,15)	t (7,34)	dt (7,61)	d (7,44)	s (-1,80)
<b>13</b>	d (8,45) s (8,49) d (8,75)	m (5,51-5,53)	m (3,66-3,71) m (3,91-3,97)	dd (8,20)	dt (7,42)	ddd (7,75)	d (7,56)	s (-1,81)
<b>16</b>	d (8,45) s (8,49) d (8,75)	m (5,51-5,53)	m (3,66-3,71) m (3,89-3,94)	d (8,20)	t (7,43)	t (7,75)	d (7,56)	s (-1,79)

Uma vez que os derivados sintetizados contêm átomos de flúor na sua estrutura, procedemos também à sua caracterização estrutural por RMN de  $^{19}\text{F}$ .

Tendo em conta a sua estrutura e sabendo que dois dos anéis pentafluorofenilo do macrociclo (posição 5 e 20) não possuem liberdade de rotação na molécula (Figura 2.14), seriam esperados três sinais devidos à ressonância dos F *orto*, dois sinais devidos à ressonância dos F *para* e três sinais devidos à ressonância de F *meta*.

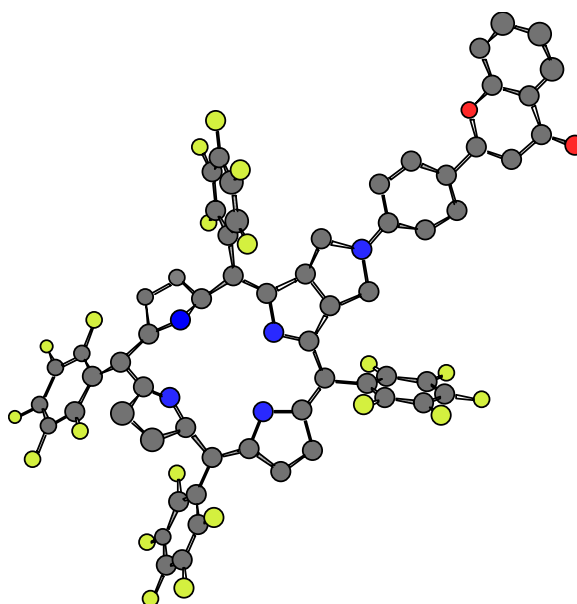


Figura 2.14- Clorina **10**.



O espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  da clorina **10** (Figura 2.15) apresenta, na zona de ressonância dos F *meta*, três sinais; um multipletto de  $\delta$  -184,93 a  $\delta$  -184,75 ppm, gerado pela ressonância dos F *meta* das posições 10 e 15, e dois duplos tripletos a  $\delta$  -183,31 e  $\delta$  -182,87 ppm, gerados pela ressonância dos F *meta* das posições 5 e 20. Os sinais gerados pela ressonância dos F *para* surgem sob a forma de dois tripletos a  $\delta$  -174,95 e  $\delta$  -173,78 ppm, enquanto que os sinais gerados pela ressonância de F *orto* surgem sob a forma de um multipletto de  $\delta$  -160,53 a -160,26 ppm e de um duplo dupto a  $\delta$  -158,43 ppm. O último foi identificado como correspondente à ressonância de dois dos F *orto* equivalentes dos anéis de pentafluorofenilo das posições adjacentes ao anel reduzido.

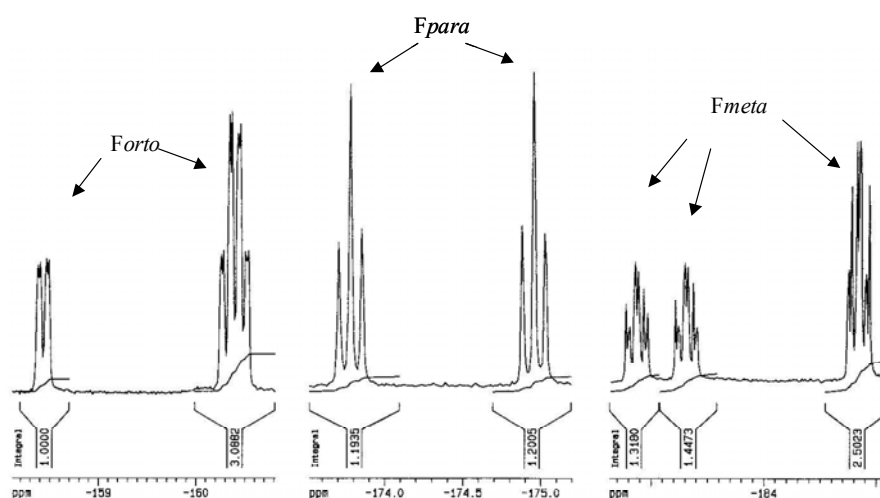


Figura 2.15- Espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  da clorina **10**.

Dadas as semelhanças estruturais entre as clorinas sintetizadas, o espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  das clorinas **13** e **16** são bastante semelhantes ao apresentado. A multiplicidade dos sinais e os desvios químicos obtidos encontram-se apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5- Desvios químicos e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  das clorinas **10**, **13** e **16**.

Clorina	F <i>meta</i> / ppm	F <i>para</i> / ppm	F <i>orto</i> / ppm
	-184,93 a -184,75 (m)		
<b>10</b>	-183,31 (dt)	-174,95 (t)	-160,53 a -160,26 (m)
	-182,87 (dt)	-173,78 (t)	-158,43 (dd)
<b>13</b>	-184,87 (dt)		-160,47 (dd)
	-183,67 (dt)	-175,01 (t)	-160,36 a -160,28 (m)
	-182,86 (dt)	-173,92 (t)	-158,49 (dd)
<b>16</b>	-184,87 (dt)		-160,47 (dd)
	-183,67 (dt)	-175,01 (t)	-160,36 a -160,28 (m)
	-182,86 (dt)	-173,92 (t)	-158,49 (dd)

## 2.4- Actividade biológica

Tendo como objectivo a procura de novas soluções farmacológicas para fotodiagnóstico de neoplasias, foram efectuados alguns ensaios preliminares relativos à avaliação da actividade biológica destes novos compostos, em colaboração com o grupo de investigação do Professor Edgar Cruz e Silva do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dado que a aplicação das porfirinas e seus derivados em fotodiagnóstico tira partido da fluorescência emitida por estes macrociclos, envolvendo portanto absorção de radiação, a avaliação da fotoestabilidade dos derivados sintetizados nas condições de luminosidade (comprimento de onda, potência e período de tempo de irradiação) em que vão ser utilizados nos ensaios biológicos, mereceu a nossa atenção.

Os ensaios relativos à citotoxicidade apresentada em contacto com uma linha celular, assim como a avaliação da localização celular e de alterações da morfologia da célula foram realizados pelo grupo de biólogos envolvido. De seguida, e na sequência da extracção dos respectivos extractos celulares, seguiu-se a determinação da quantidade de

fotossensibilizador associado às células que foi efectuada, já no nosso grupo de investigação. Esta quantificação foi realizada recorrendo ao método fluorimétrico.

#### **2.4.1- Estudos de fotoestabilidade**

A fotodegradação é definida como o decréscimo de absorção de um cromóforo causada pela incidência de radiação na zona do visível do espectro electromagnético. Quer ao nível da fotoquímica quer ao nível da fotobiologia, o termo fotodegradação é mais abrangente e surge definido como a perda de absorção ou de intensidade de emissão de fluorescência por acção de radiação electromagnética.<sup>40-41</sup> No entanto, a fluorescência emitida é susceptível à ocorrência de vários efeitos supressores e portanto, a diminuição de emissão de fluorescência nem sempre acompanha a diminuição de absorvência.<sup>41</sup> Tendo em consideração este facto, a avaliação da fotoestabilidade dos derivados porfirínicos em estudo foi efectuada por espectroscopia de UV-Vis.

Durante o processo de fotodegradação, podem acontecer duas situações que são designadas por:<sup>40-41</sup>

- fotomodificação quando a nova espécie química mantém a estrutura do cromóforo.
- verdadeira fotodegradação quando envolve modificações químicas mais profundas.

A nível de espectro de UV-Vis, a fotomodificação de macrociclos porfirínicos traduz-se numa diminuição das respectivas bandas Soret e Q, e no aparecimento dessas mesmas bandas a comprimentos de onda ( $\lambda$ ) diferentes, característicos de uma forma quimicamente modificada. O espectro de UV-Vis de um macrociclo porfirínico que apresente verdadeira fotodegradação é caracterizado apenas por uma diminuição de todas as suas bandas características. Este tipo de comportamento espectroscópico sugere que, no último caso, se formam pequenos fragmentos incolores resultantes da degradação do cromóforo inicial. Estes dois processos poderão não ocorrer de forma independente; de facto, *in vivo* e *in vitro* a ocorrência de fotomodificação pode ocorrer simultaneamente com a verdadeira fotodegradação.<sup>40</sup>

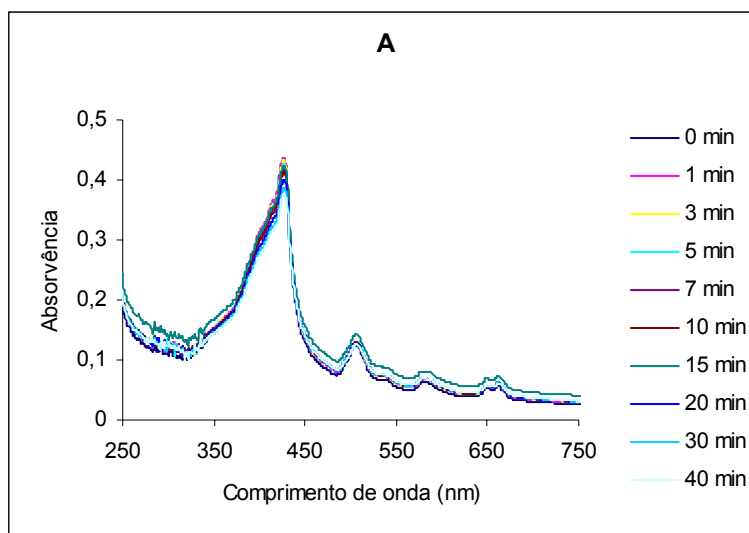
Estudos efectuados em diversos macrociclos porfirínicos usados em PDT, revelam que estes são degradados por acção da luz.<sup>40-43</sup> No entanto, o uso de moléculas estáveis sob acção da luz em medicina, apresenta a grande vantagem da quantidade de

fotossensibilizador presente no tecido tumoral se manter inalterada ao longo do tempo de irradiação, não ocorrendo redução de eficiência da sua actividade.

Para avaliação da fotoestabilidade dos compostos **1-4** e **6**, foram preparadas soluções de concentração 1  $\mu\text{M}$  de cada um dos derivados em PBS com 5% de DMSO. A escolha do solvente usado foi feita com base nas condições experimentais usadas nos estudos de avaliação biológica.

Cada uma das soluções preparadas foi colocada numa célula de quartzo de fluorescência (1 cm) e sujeita a irradiação com luz branca (400-800 nm, 20 J/cm<sup>2</sup>) durante 40 minutos à temperatura ambiente. Durante a irradiação, as soluções foram mantidas em agitação mecânica e em célula aberta. Os espectros de absorção de cada uma das amostras, a períodos de tempo de irradiação preestabelecidos (0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos), foram registados de forma a acompanhar as possíveis alterações do comportamento espectroscópico dos compostos em estudo ao longo do tempo total de irradiação.

A título de exemplo, são apresentados os espectros de UV- Vis dos derivados **1**, **2** e **3** (Figura 2.16), respeitantes às medições de absorvência efectuadas (segundo o procedimento descrito anteriormente).



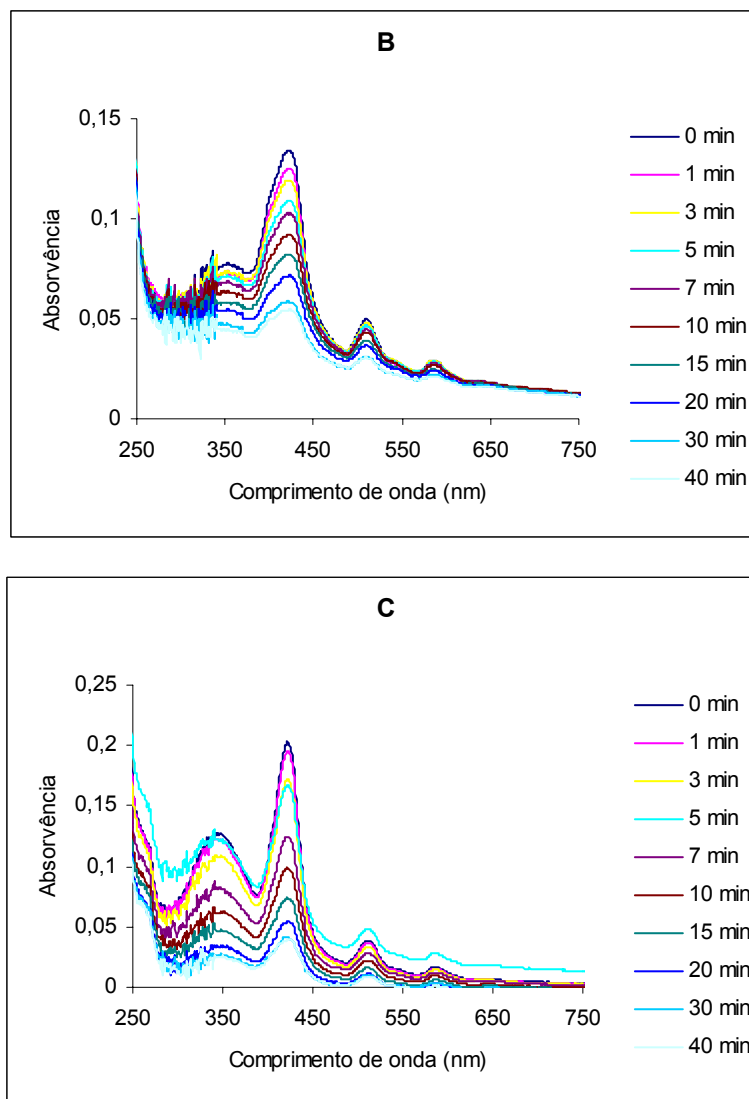


Figura 2.16- Espectros de absorção no visível das porfirinas fluoradas após vários tempos de irradiação: (A) derivado 1. (B) derivado 2. (C) derivado 3.

Mediante a análise da Figura 2.16, é possível verificar a diminuição de todas as bandas de absorção típicas dos derivados **1-3** ao longo do tempo de irradiação sem que surjam novas bandas de absorção na zona do visível. Há ainda a referir que o mesmo tipo de comportamento espectroscópico foi demonstrado pelos derivados **4** e **6** quando sujeitos a igual avaliação de fotoestabilidade. Numa fase inicial, os resultados obtidos parecem fazer transparecer o elevado grau de degradação das diferentes amostras por acção da luz, segundo o tipo de degradação definido anteriormente como “verdadeira fotodegradação”.

No entanto, algumas observações casuais efectuadas durante os estudos, levantaram dúvidas quanto à responsabilidade da irradiação no decaimento de absorvência verificado.

De facto, e procedendo a medições consecutivas de absorvência de soluções não irradiadas e mantidas no escuro, verificámos também a redução no valor da absorvência ao longo do tempo (Tabela 2.6). Convém ainda salientar que os resultados experimentais apresentados na Tabela 2.6 foram obtidos recorrendo à homogeneização por agitação manual para os compostos **2** e **3**, enquanto que para o derivado **6** as medições foram efectuadas após homogeneização durante 1 minuto no equipamento de ultra-sons.

Tabela 2.6- Quantidade relativa de composto (**2**, **3** e **6**) presente nas soluções 1 µM em PBS com 5% de DMSO, a diferentes tempos na presença (IR)/ausência (NIR) de luz.

Derivado		Tempo (min)									
		0	1	3	5	7	10	15	20	30	40
<b>2</b>	IR	100	93	89	82	77	69	61	54	44	41
	NIR	100	98	94	92	84	86	83	79	74	70
<b>3</b>	IR	100	96	84	82	61	49	36	27	20	19
	NIR	100	98	96	77	70	65	58	51	44	40
<b>6</b>	IR*	100	94	81	73	68	61	56	52	46	45
	NIR*	100	96	90	85	80	73	64	57	53	46

\*- Soluções homogeneizadas, previamente ao início das medições, durante 1 minuto no ultra-sons.

Os valores vêm expressos em percentagem=  $(Abs_t / Abs_{t0}) \times 100$

Foi ainda possível observar que esses valores de absorvência eram dependentes do tipo de homogeneização da amostra: soluções do mesmo derivado, sujeitas a homogeneização manual ou a homogeneização com recurso a ultra-sons (1 min), conduziram a diferenças significativas nos valores de absorvência, mesmo na ausência de luz (Tabela 2.7).

Assim, no sentido de avaliar o efeito do tipo de homogeneização da amostra nos resultados experimentais, efectuámos (apenas para o derivado **6**) o mesmo tipo de estudo, na presença de luz. A Tabela 2.7 apresenta os valores experimentais obtidos.

Tabela 2.7- Quantidade relativa de fotossensibilizador em função do tipo de homogeneização da amostra, quando irradiada com luz branca (400-800 nm, 20J/cm<sup>2</sup>).

Derivado		Tempo (min)									
		0	1	3	5	7	10	15	20	30	40
6	US	100	94	81	73	68	61	56	52	46	45
	AM	100	97	91	87	84	79	75	72	68	67
	Δ	--	3	10	15	16	18	19	20	22	22

US- Homogeneização com recurso a ultra-sons; AM- Homogeneização manual; Δ- diferença de absorvência observada (AM-US). Os valores vêm expressos em percentagem=  $(Abs_t / Abs_{t0}) \times 100$

Pela análise dos resultados obtidos e sumariados na Tabela 2.7, podemos concluir que o método da homogeneização de amostra poderá, se não for tido em consideração, conduzir a interpretações erradas dos resultados experimentais; verificou-se que a mesma solução, homogeneizada de forma diferente, conduz a valores de absorvência diferentes. Por exemplo, ao fim de 40 minutos, uma amostra homogeneizada por ultra-sons ou por agitação manual apresentam uma diferença de 20% no valor da absorvência. A análise deste parâmetro alerta para o facto de que poderá existir outro factor, relacionado provavelmente com a fraca solubilidade dos derivados no solvente usado que, paralelamente à acção da luz, contribui para o comportamento espectroscópico verificado.

Face ao grande número de variáveis com que nos deparámos, e à existência de algumas dúvidas devido à incoerência de alguns dos resultados experimentais obtidos, dedicámo-nos um pouco mais ao estudo do comportamento destes derivados em solução de PBS com 5% de DMSO.

Segundo diversos estudos descritos na literatura,<sup>44-47</sup> as porfirinas e os seus derivados podem formar diferentes tipos de agregados (agregados de tipo J, agregados de tipo H e agregados não específicos) em solução aquosa. As interacções podem influenciar a eficiência de um fotossensibilizador na medida em que alteram as suas propriedades fotofísicas (nomeadamente em termos de absorção e de rendimento quântico de fluorescência) e podem alterar a sua afinidade quer para com as células tumorais, quer para com as células normais.<sup>44</sup>

A par da fluorescência, a espectroscopia de UV-Vis é um dos métodos usados para confirmar a presença de formas agregadas, na medida em que o fenómeno de agregação é

normalmente acompanhado por desvios no comprimento de onda dos máximos das bandas de absorção e por uma diminuição das mesmas comparativamente às formas monoméricas.<sup>44-47</sup>

Iniciámos o nosso estudo pela análise dos espectros de UV-Vis de cada um dos derivados. As porfirinas **1-4** e **6** apresentam espectros de UV-Vis típicos de macrociclos porfirínicos na sua forma livre: a banda Soret, que apresenta uma forte banda de absorção na zona de 410-420 nm e ainda quatro bandas Q entre os 480 e os 650 nm. A principal diferença observada entre os espectros de cada derivado é a intensidade relativa de cada uma das bandas Q; os derivados fluorados **1-3** apresentam espectros de visível classificados como de tipo *oxo-rhodo* dado que a intensidade de absorção das bandas Q varia de acordo com  $\text{III} > \text{II} > \text{IV} > \text{I}$ . Por outro lado, os espectros de visível dos derivados **4** e **6** são do tipo *etio*, uma vez que a intensidade de absorção das bandas Q varia de acordo com  $\text{IV} > \text{III} > \text{II} > \text{I}$ .

De seguida, e com o intuito de comparar os espectros de UV-Vis de cada um dos derivados na forma monomérica (em solução de DMSO) com os espectros de UV-Vis dos mesmos derivados em solução aquosa de PBS com 5% de DMSO, foram preparadas soluções de cada um dos fotossensibilizadores em estudo a uma concentração de 1  $\mu\text{M}$  nestes dois solventes. Após 40 minutos, foram efectuados os respectivos espectros e a título de exemplo apresentam-se os espectros de visível da porfirina **6** em soluções de DMSO e de PBS com 5% DMSO (Figura 2.17).

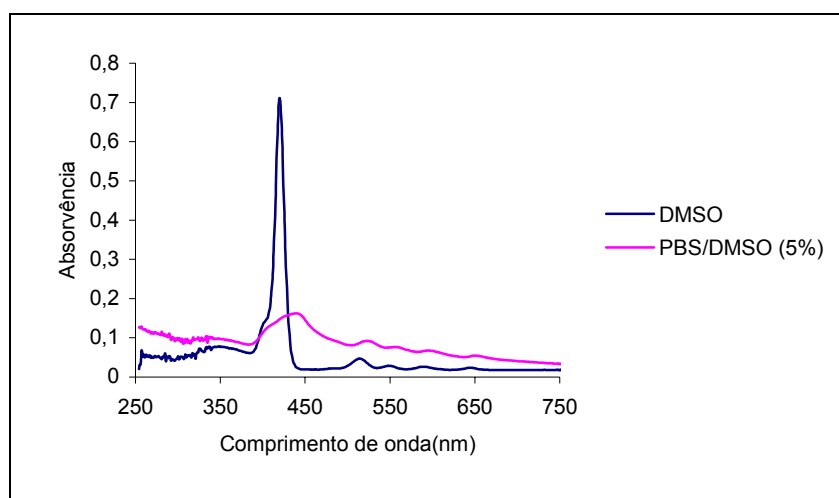


Figura 2.17- Espectros de absorção de uma solução de porfirina **6** em DMSO e em solução de PBS com 5% de DMSO, após 40 minutos da sua preparação.



Em solução de PBS com 5% de DMSO, o espectro de absorvência do derivado **6**, apresenta a banda Soret bastante menos intensa e alargada comparativamente com o espectro de absorvência do mesmo composto em DMSO. Por outro lado, o seu máximo de absorção, assim como os máximos das respectivas bandas Q, sofrem desvios batocrômicos (absorção a comprimentos de onda superiores). Segundo a literatura, este tipo de comportamento é típico de agregados de tipo J, isto é, agregados que correspondem a uma organização ordenada e unidimensional de várias unidades monoméricas resultantes de interações co-faciais e cabeça-cauda.

Os resultados obtidos para as porfirinas **1-4** também sugerem a presença de agregados de tipo J em soluções aquosas de PBS com 5% DMSO. Na Tabela 2.8 apresentam-se os  $\lambda$  (nm) relativos aos máximos de absorvência para cada uma das bandas características das porfirinas estudadas nestes dois solventes.

Tabela 2.8- Comprimentos de onda relativos aos máximos de absorvência para cada uma das bandas características das porfirinas **1-4** e **6** em diferentes solventes.

$\lambda$ (nm)						
Derivado	Solvente	Soret	IV	III	II	I
<b>1</b>	A	411	504	536	579	632
	B	427	506	536	579	650
<b>2</b>	A	411	505	536	579	632
	B	420	510	md	586	md
<b>3</b>	A	413	506	536	580	633
	B	422	512	md	587	md
<b>4</b>	A	419	514	549	589	646
	B	423	519	553	593	650
<b>6</b>	A	420	514	549	589	644
	B	440	523	556	594	651

A) DMSO; B) PBS com 5% de DMSO.

md- Banda mal definida.

Suspeitando que o efeito de agregação seja o responsável pela diminuição da quantidade de fotossensibilizador durante os estudos realizados, decidimos determinar a

fotoestabilidade num solvente em que estes fossem totalmente solúveis. Escolhemos a DMF por ser este um solvente normalmente usado neste tipo de estudos e no qual estes derivados são solúveis e se encontrarem na forma monomérica. A Tabela 2.9 mostra os valores de absorvência obtidos para os derivados **1-4** e **6** quando sujeitos a irradiação segundo as condições experimentais anteriormente descritas mas agora usando DMF como solvente.

Tabela 2.9- Quantidade relativa de fotossensibilizador presente na solução de 1  $\mu\text{M}$  em DMF, a diferentes tempos de irradiação com luz branca (400-800 nm, 20 J/cm<sup>2</sup>).

Derivado ( $\lambda_{\text{max}}$ , Soret)	Tempo de irradiação (min)									
	0	1	3	5	7	10	15	20	30	40
<b>1</b> (409 nm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>2</b> (412 nm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>3</b> (412 nm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>4</b> (418 nm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>6</b> (419 nm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Pela análise dos resultados obtidos, concluímos que nenhuma das porfirinas estudadas apresenta fotodegradação em DMF durante o período de irradiação testado. Apesar dos resultados serem referentes a diferentes condições experimentais devido ao uso de diferentes solventes, parece-nos aceitável concluir que o decréscimo de absorvência verificado ao longo do período de irradiação pelos derivados **1-4** e **6** em PBS com 5% de DMSO é devido, maioritariamente, a efeitos de agregação.

#### **2.4.2- Estudos de viabilidade, morfologia e localização celulares**

Os primeiros estudos efectuados dizem respeito à avaliação dos efeitos produzidos pelos macrociclos porfirínicos sintetizados (derivados **1-4** e **6**) sobre a viabilidade celular da linha celular COS-7 (derivada de rim de macaco), sendo de seguida avaliados os efeitos produzidos na morfologia das células após exposição aos mesmos derivados porfirínicos.

Nesta secção faz-se referência, de uma forma sucinta, aos procedimentos usados pelo grupo colaborador do Departamento de Biologia nos estudos de avaliação biológica efectuados.

A viabilidade celular na presença dos diferentes derivados foi seguida pelo método de redução do MTT. É um teste espectrofotométrico que tem como princípio a capacidade das desidrogenases mitocondriais converterem o MTT (sólido amarelo, solúvel em água) num sal violeta escuro e insolúvel. A quantidade deste produto é directamente proporcional ao número de células viáveis.

No sentido de avaliar os efeitos produzidos por diferentes concentrações dos derivados porfirínicos na viabilidade celular, as células foram expostas a várias concentrações de cada um dos fotossensibilizadores (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ). Dado que a possível aplicação destes compostos em fotodiagnóstico de neoplasias envolve a acção da luz, os ensaios de viabilidade celular foram realizados quer na presença quer na ausência de radiação. O tempo total de exposição desta linha celular aos derivados porfirínicos foi de 24 horas para ambos os casos. No entanto, nos ensaios efectuados na presença de luz, as células, após exposição aos derivados porfirínicos durante 22 horas, foram irradiadas durante 10 minutos com luz branca (400-800 nm) com uma energia de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

A Figura 2.18 apresenta os resultados experimentais obtidos para este teste. Os valores obtidos na ausência dos derivados porfirínicos surgem definidos como controlo e correspondem a 100% de viabilidade celular. Os restantes valores experimentais são expressos como percentagem relativa ao controlo. Por exemplo, 80% de viabilidade celular indica um decréscimo de 20% no número de células viáveis em relação ao número de células viáveis do controlo.

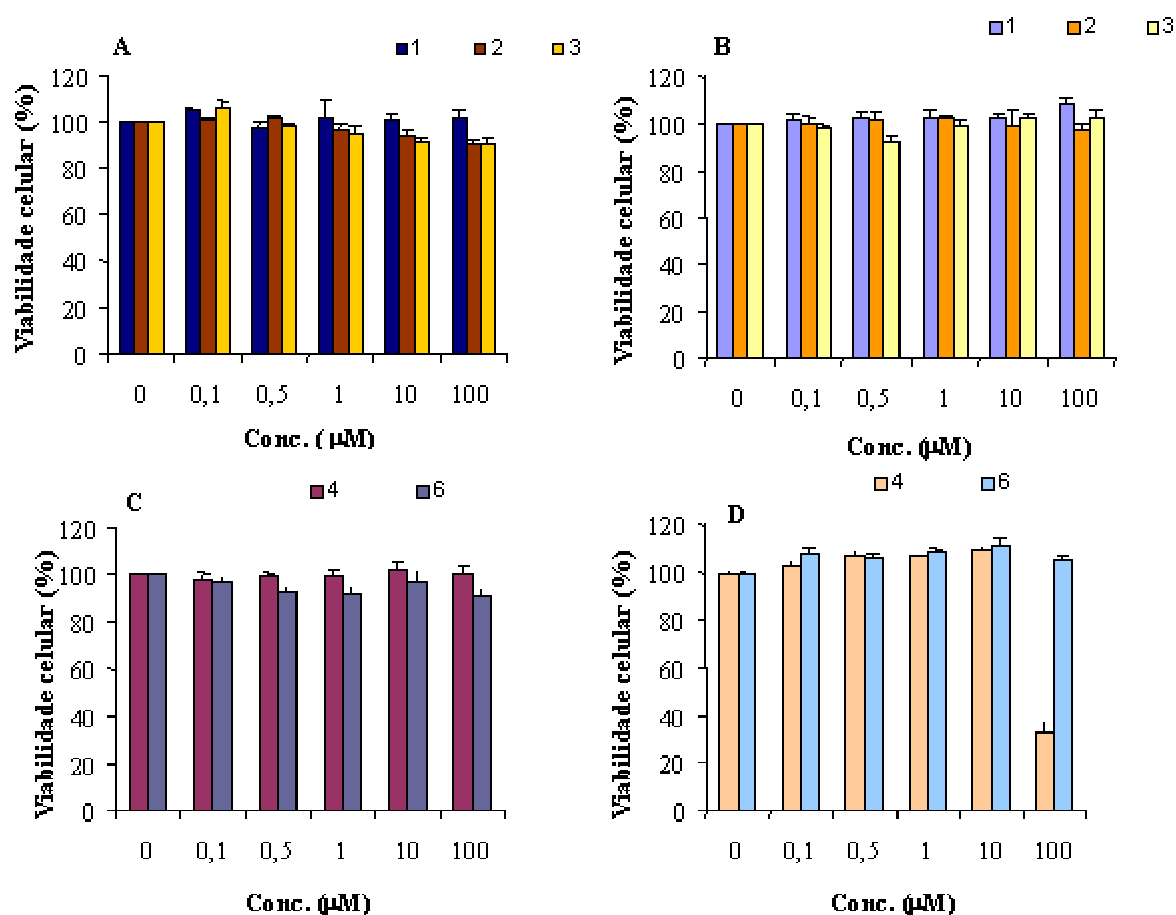


Figura 2.18- Resultados experimentais da viabilidade celular de células COS-7, determinada pelo teste de redução do MTT na presença e ausência de luz (400-800 nm, 20 J/cm<sup>2</sup>, tempo de irradiação 10 min.): A) derivados 1-3: ausência de luz. B) derivados 1-3: presença de luz. C) derivados 4 e 6: ausência de luz. D) derivados 4 e 6: presença de luz.

Os resultados experimentais dos ensaios de viabilidade celular (Figura 2.18), demonstram que nenhum dos derivados estudados apresenta citotoxicidade para esta linha celular na ausência de luz. No entanto, o derivado 4 é significativamente fotocitotóxico a uma concentração de 100 µM, reduzindo em 70% o número de células viáveis após 10 minutos de irradiação com luz branca e com uma energia total de 20 J/cm<sup>2</sup>. Nenhum dos restantes compostos testados se mostrou tóxico ou fototóxico para esta linha celular, a todas as concentrações testadas.

Para avaliar a possível ocorrência de alterações na morfologia da célula foram também analisadas algumas microfotografias de epifluorescência células incubadas com fotossensibilizador quando irradiadas e não irradiadas. Na Figura 2.19 são apresentadas também as microfotografias de epifluorescência de células COS-7 sem fotossensibilizador (célula controle) com e sem luz.

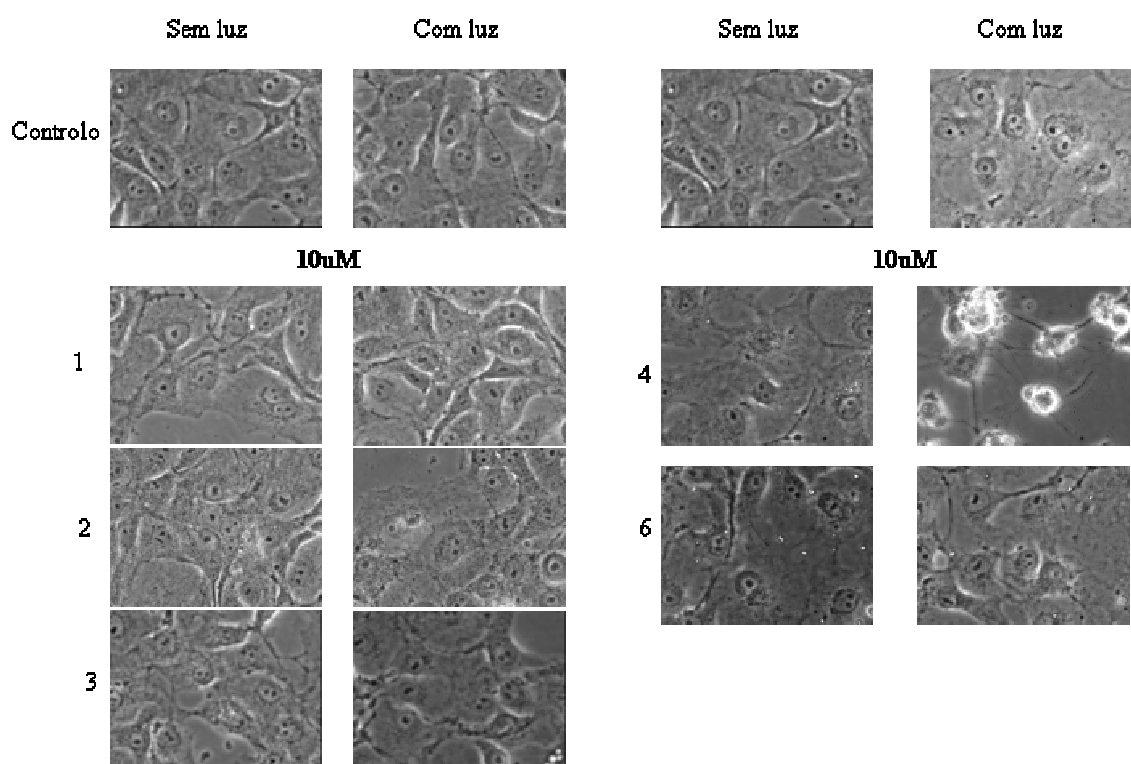


Figura 2.19- Microfotografias de epifluorescência (ampliação 60 $\times$ ) de células COS-7 tratadas com os compostos **1-4** e **6** (10  $\mu$ M) na presença e na ausência de luz branca (400-800 nm, 20 J/cm<sup>2</sup>, 10 minutos de irradiação).

Para todos os casos microvisionados, a morfologia das células mantém-se inalterada nas condições experimentais utilizadas (expostos e não expostos a irradiação). Foi ainda possível verificar que os derivados **2**, **3** e **6** marcam preferencialmente os núcleos/nucléolos das células.

#### **2.4.3- Determinação da quantidade de fotossensibilizador associado às células COS-7**

Um fotodiagnóstico eficiente pressupõe, entre outros requisitos, que o fotossensibilizador se acumule preferencialmente no meio intracelular, ou pelo menos, que estabeleça algum tipo de interacção com as células. Desta forma, a determinação da quantidade de composto acumulado na célula é um dos parâmetros a ter em consideração. Para tal, as células COS-7 foram incubadas com cada um dos compostos em estudo (derivados **1-4** e **6**, 10  $\mu\text{M}$ ) e posteriormente lavadas. Os respectivos extractos celulares foram obtidos em SDS após raspagem e posterior sonicação. No sentido de avaliar a acumulação intracelular dos derivados porfíricos mediante o tempo de contacto com a célula, foram realizados ensaios considerando diferentes tempos de incubação destas células com o fotossensibilizador numa concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

A determinação da quantidade de fotossensibilizador associado às células COS-7 (Tabela 2.10) foi efectuada por análise espectrofluorimétrica dos extractos celulares. Após construção de uma recta de calibração, mediante medição dos valores de emissão de fluorescência de soluções de concentrações rigorosamente conhecidas de cada um dos derivados em estudo excitados no comprimento de onda da banda Soret, procedemos à interpolação dos valores de emissão de fluorescência de cada um dos extractos celulares com a respectiva recta de calibração. Desta forma, é possível a conversão eficiente dos valores de intensidade de emissão de fluorescência em nmol de fotossensibilizador presente. A quantidade de fotossensibilizador associado apresenta-se expresso em nmol de fotossensibilizador/mg de proteína celular.

Para proceder à medição da fluorescência dos vários extractos celulares foi necessário diluir uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do respectivo extracto em 3 mL de SDS.

Tabela 2.10- Quantidade de fotossensibilizador (nmol de porfirina/mg de proteína) associado às células COS-7 após diferentes tempos de incubação com cada um dos derivados a uma concentração de 10  $\mu$ M.

Derivado	Tempo de incubação (h)				
	0,5	1	2	4	24
2	797	909	1027	934	1253
3	1178	1224	1248	1492	3072
4	6711	6205	9542	10296	46885
6	1656	1662	3693	3002	1982

No que respeita ao derivado **1**, não foi possível determinar de forma correcta a quantidade de composto associado a esta linha celular. A sua estrutura molecular poderá estar na origem da grande variabilidade de resultados obtidos ao longo do tempo de incubação. Sendo uma porfirina bastante apolar a sua solubilidade em meios fisiológicos é bastante reduzida, dificultando o seu transporte através da membrana celular. Por outro lado, a elevada insolubilidade deste derivado em DMSO e em água poderá conduzir à sua precipitação na célula (quer dentro quer à superfície) dificultando o processo de lavagem e conduzindo à presença nos extractos celulares, não apenas da quantidade de porfirina presente no meio intracelular, mas também de resíduos de derivado associado à célula devido a um processo de lavagem ineficiente.

Relativamente aos restantes macrociclos porfirínicos, é possível definir um carácter evolutivo ao longo do tempo de incubação: verifica-se um aumento da quantidade de fotossensibilizador associado às células COS-7 com o aumento do tempo de incubação para os derivados **2**, **3** e **4**, enquanto que o derivado **6** apresenta um valor máximo ao fim de duas horas de incubação.

Considerando os valores máximos de acumulação apresentados, observa-se que o derivado que melhor se associa a este tipo de células é o derivado **4** após 24 horas de incubação. Segue-se o derivado **6** que apresenta o máximo de acumulação intracelular após duas horas de incubação, enquanto que o derivado **2** apresentou, para as condições estudadas, a menor capacidade de acumulação. Estes resultados podem ser relacionados com a estrutura molecular dos derivados. A presença de grupos metoxilo como substituintes dos fenilos nas posições *meso* do núcleo porfirínico é referida em diversos

estudos como grupos substituintes que permitem o aumento da afinidade para diversas linhas celulares. Tendo em consideração estes estudos, era esperado que os derivados **4** e **6** apresentassem bons resultados de acumulação intracelular. Em adição, a presença de um grupo carboxilo na estrutura molecular do derivado **4**, confere a esta molécula um carácter anfífilico facilitando não só a sua solubilidade como também o transporte através da membrana celular. Pela mesma razão, será de esperar que o derivado **6**, sendo um derivado menos polar, apresente uma acumulação intracelular inferior ao seu precursor. No que diz respeito aos derivados fluorados **2** e **3**, verifica-se um aumento da acumulação intracelular com o aumento do número de substituições de átomos de flúor por moléculas de calcona.

Há ainda a referir que os valores máximos de acumulação intracelular dos derivados **3** e **6** são comparáveis após 24 horas e 2 horas de incubação, respectivamente.

#### **2.4.4- Conclusão e discussão de resultados**

O acoplamento de calconas a macrociclos porfirínicos, conduziu à síntese de novos derivados de tipo porfirina-calcona com rendimentos razoáveis.

As *N*-flavonilglicinas testadas reagem com a porfirina 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **1** em reacções de cicloadição 1,3-dipolar, conduzindo à formação das correspondentes clorinas como produtos maioritários da reacção. Os derivados *N*-(4-flavonilglicina) **7** e *N*-(3-flavonilglicina) **8** apresentam reactividades semelhantes, e geram espécies 1,3-dipolares mais reactivas do que o derivado *N*-(2-flavonilglicina) **9**, indicando que a reactividade deste tipo de 1,3-dipolo pode estar relacionada com a posição do substituinte NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H no anel B da flavona. Esta diferença de reactividade é também visível pela formação de bis-aductos apenas quando a reacção é efectuada com as *N*-flavonilglicinas **7** e **8**. Nestes casos, verificou-se a formação preferencial da isobacterioclorina correspondente, o que está de acordo com resultados obtidos em reacção 1,3-dipolar de porfirinas e iletos de azometino obtidos anteriormente neste grupo de investigação e disponíveis na literatura.

Os derivados **1-3**, **4** e **6** foram sujeitos a alguns estudos de avaliação biológica, permitindo inferir acerca da possível relação entre a sua estrutura e algumas propriedades biológicas apresentadas.



O acoplamento de calcona à unidade porfirínica é responsável pela alteração da afinidade destes derivados para a linha celular estudada. Desta forma, e considerando o caso da porfírina **1** que não apresenta afinidade para a linha celular em estudo, o seu acoplamento a moléculas de tipo calcona facilita a incorporação celular. Neste caso, o aumento do número de substituintes deste tipo conduz a um aumento de acumulação intracelular. No caso de porfirinas como o composto **4**, com grupos substituintes que favorecem a sua acumulação, a substituição do um grupo carboxilo por uma molécula de calcona não é tão vantajosa como no caso anterior, conduzindo à diminuição da acumulação intracelular.

Os resultados de acumulação intracelular obtidos poderão justificar os resultados dos testes de toxicidade; a toxicidade apresentada pela porfírina **4** na presença de luz poderá estar relacionada com a sua maior acumulação intracelular face ao derivado **6** que não apresenta toxicidade na presença de luz à mesma concentração.

Por outro lado, a ausência de toxicidade de **1** poderá também ser atribuída à ausência de afinidade para esta linha celular, dada a baixa solubilidade em meios fisiológicos. Da mesma forma a ausência de citotoxicidade dos derivados **2** e **3** poderão também ser justificados pelos baixos valores de acumulação intracelular face à porfírina **4**.

No entanto, não devem ser de forma alguma descuidados, outros factores que poderão estar na origem da ausência de citotoxicidade apresentada pelos derivados porfirínicos **2**, **3** e **6**. Considerando a estrutura molecular destes derivados e verificando que possuem em comum o facto de estarem acoplados a uma ou quatro unidades de calcona, existe a forte possibilidade do resíduo calcona exercer um efeito protector, impedindo assim a morte celular.

Estão a ser realizados outros estudos biológicos que esperamos venham a ser conclusivos acerca do modo de acção deste tipo de derivados e da possível relação entre estrutura/citotoxicidade apresentadas.

## **2.5- Parte experimental da síntese**

### **2.5.1- Reagentes, solventes e equipamento**

A 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona foi gentilmente cedida pelo Professor Artur Silva do grupo de Investigação da Unidade de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares da Universidade de Aveiro, tendo sido sintetizada no âmbito de outro projecto de investigação.

As *N*-flavonilglicinas **7**, **8** e **9** foram gentilmente cedidas para a realização deste trabalho pela Doutora Ana Barros. Estes derivados foram preparados no âmbito do seu Doutoramento, realizado sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Silva.

Os reagentes comerciais utilizados na síntese não foram sujeitos a purificação prévia visto serem de elevado grau de pureza.

Os solventes usados nos processos envolvendo síntese e cristalização foram, sempre que necessário sujeitos a purificação prévia: o DMSO foi seco, por aquecimento a refluxo sobre hidreto de cálcio, seguida de destilação a pressão normal; a piridina foi seca, por aquecimento a refluxo sobre lentilhas de hidróxido de sódio, seguida de destilação; o tolueno foi seco sob fio de sódio; o THF foi seco, por aquecimento a refluxo sobre potássio metálico e benzofenona, seguida de destilação após o aparecimento de uma tonalidade azul intensa na solução.

Os solventes usados na fase de purificação foram previamente destilados e passados por uma coluna de alumina neutra activada.

A evolução das reacções foi sempre efectuada por TLC, usando folhas plásticas revestidas de sílica gel 60, da Merck.

A separação dos componentes das várias misturas reaccionais foi quase sempre efectuada recorrendo a técnicas de cromatografia em coluna de sílica gel de 0,063-0,200

mm (Merck), ou por cromatografia em coluna de sílica gel S de 0,032-0,063 mm, da Riedel-de-Häen. Quando, necessário recorreu-se à cromatografia de camada fina preparativa revestindo placas de vidro (20×20 cm) com uma camada de sílica gel 60 (Merck) com uma espessura de 0,5 mm. Após revestimento, as placas foram activadas na estufa a 100 °C durante 10 horas.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e de  $^{19}\text{F}$  foram registados num aparelho Bruker DRX 300 (300,13, 75,45 e 282,38 MHz, respectivamente), ou num aparelho DRX 500 (a 500,13 e 125,76 MHz, para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente). O padrão interno usado foi o TMS ( $\delta$  0 ppm), no caso dos espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . No caso dos espectros de  $^{19}\text{F}$  foi usado como referência o  $\text{C}_6\text{F}_6$  considerando o correspondente sinal a  $\delta$  -163 ppm, tendo como referência primária o  $\text{CFCl}_3$  ( $\delta$  0 ppm). O solvente deuterado usado foi o  $\text{CDCl}_3$ .

Os estudos de avaliação biológica e avaliação da fotoestabilidade foram efectuados usando uma fonte de radiação LUMACARE LC112 equipada com uma fibra óptica de luz branca de 400-800 nm. A potência de radiação foi determinada e aferida através dum potenciómetro luminoso Spectra-Physics modelo 407 acoplado a um sensor 407 A-2.

Os espectros de massa de baixa resolução em  $\text{FAB}^+$  foram realizados num espectrómetro VG AutoSpecQ, usando o álcool 3-nitrobenzílico (NBA) como matriz.

Os espectros de UV-Vis foram registados num espectrofotómetro Uvikon-922 usando células de vidro de 1cm e, sempre que se justificou, células de quartzo com igual percurso óptico.

As análises elementares foram efectuadas num aparelho CHNS LECO 932 no Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

### **2.5.2- Síntese das porfirinas 1 e 4**

A síntese da porfirina **1** encontra-se descrita na literatura. No entanto, é importante referir que o método usado foi uma variante do método de Rothmund, que envolve a condensação de pirrol e do aldeído aromático (ou dos aldeídos nas proporções adequadas, no caso da síntese da porfirina assimétrica) numa mistura de ácido acético e nitrobenzeno, a refluxo.<sup>20</sup>

De forma análoga, a porfirina **4** foi também sintetizada segundo o mesmo método, mas envolvendo uma mistura de aldeídos adequada.

### **2.5.3- Acoplamento de macrociclos porfirínicos a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona**

#### *2.5.3.1- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado 2.*

A uma solução de 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona (9,3 mg, 28 µmol) em DMSO (1,5 mL) foram adicionados 80 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e a solução foi deixada à temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto, até se verificar alteração da cor da solução de amarelo para rosa. Adicionou-se então a porfirina **1** (53,8 mg, 55 µmol) e aqueceu-se a solução a 50 °C durante três horas. Findo este período, terminou-se a reacção procedendo à lavagem da mistura reaccional com água destilada. A mistura reaccional foi extraída com clorofórmio e a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro. De seguida procedeu-se à purificação da mistura reaccional por cromatografia em coluna de sílica gel. O eluente escolhido foi uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (2:1), tendo-se recolhido em primeiro lugar a porfirina de partida que não reagiu (50%), e de seguida uma fracção rosa contendo material porfirínico. Esta fracção, foi purificada por TLC preparativa utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (2:1) e revelou ser constituída por uma mancha rosa francamente maioritária e por duas fracções rosa de R<sub>f</sub> muito semelhantes. O composto maioritário corresponde ao derivado **2** que foi obtido, após cristalização numa mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, com um rendimento de 44%. As duas

fracções menos polares, de quantidades não mensuráveis, foram identificadas por espectrometria de massa como produtos resultantes de di-substituição.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$  + TFA)  $\delta$ : 5,22 (s, 2H, Calc- $\text{CH}_2$ ), 7,14 (d,  $J$ = 8,8 Hz, 2H, Calc-H-3 e H-5), 7,34 (d,  $J$ = 8,3 Hz, 1H, Calc-H-3'), 7,43 (d,  $J$ = 15,8 Hz, 1H, Calc-H- $\alpha$ ), 7,36-7,44 (m, 5H, Calc-H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''), 7,49-7,51 (m, 1H, Calc-H-5'), 7,75 (d,  $J$ =8,8 Hz, 2H, Calc- H-2 e H-6), 7,78-7,80 (m, 1H, Calc-H-4'), 7,80 (dd,  $J$ = 7,4 e 1,76 Hz, Calc- H-6'), 7,94 (d,  $J$ = 15,8 Hz, Calc-H- $\beta$ ), 9,00, 9,02 e 9,13 (d, s, d,  $J$ = 5,0 Hz, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$  + TFA)  $\delta$ : 71,0 ( $\text{OCH}_2$ ); 116,3; 123,2; 125,3; 128,3; 128,8; 128,9; 130,0; 131,0; 132,1; 134,1; 135,7; 145,3; 146,1; 146,3; 153,4; 154,4 (C-2'), 162,5; 196,7 (C=O). **RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$  + TFA)  $\delta$ : -183,41 a -183,30 (m, 2F, 5- Ar-F-*m*), -175,70 (d,  $J$ = 11,3 Hz, 6F, 5,10,15,20-Ar-F-*m*), -168,8 a -168,6 (m, 3F, 10, 15, 20- Ar-F-*p*), -161,9 (d,  $J$ = 14,1 Hz, 2F, 5 -F-*o*), -161,6 (d,  $J$ = 14,1 Hz, 6F, 10,15,20-Ar-F-*o*). **EM ( $\text{FAB}^+$ )  $m/z$**  1284 ( $\text{M}^+$ ); p.f.: 289-290 °C. **UV-VIS**  $\lambda$  max. nm ( log  $\epsilon$ ) em DMSO : 411 (5,47), 536 (não calculado), 506 (4,35), 579 (3,85), 632 (2,91). **Análise elementar**: Encontrado (%): C 61,04; H 2,14; N 4,41. Calculado para  $\text{C}_{66}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3\text{F}_{19}\cdot\text{H}_2\text{O}$ : C 60,84; H 2,24; N 4,30.

#### *2.5.3.2- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado 3.*

A uma solução de 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona (41,4 mg; 125  $\mu\text{mol}$ ), em 1,5 mL de DMSO, foram adicionadas cerca de 80 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A mistura reaccional foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação mecânica e em atmosfera de azoto. Após alteração da cor da solução de amarelo para rosa, procedeu-se à adição de porfirina **1** (21,1 mg; 21,7  $\mu\text{mol}$ ). De seguida, aqueceu-se a mistura reaccional a 100 °C, e terminou-se a reacção após 3 horas, depois de se observar por TLC o consumo total do macrociclo porfirínico de partida. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi lavada com água, extraída com clorofórmio e a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro. De seguida procedeu-se à purificação da mistura reaccional por cromatografia em coluna, e a fracção maioritária foi extraída usando clorofórmio como eluente. Esta fracção,

foi posteriormente purificada por TLC preparativa utilizando o mesmo eluente. O composto maioritário foi identificado como sendo o derivado **3**, que após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo, foi obtido com um rendimento de 33%.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3 + \text{TFA}$ )  $\delta$  (ppm): 5,14 (s, 8H, Calc- $\text{CH}_2$ ), 7,07 (d,  $J=8,8$  Hz, Calc-H-3 e H-5), 7,31 (d,  $J=8,4$  Hz, 4H, Calc-H-3'), 7,33-7,42 (m, 24H, Calc-H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'' e H- $\alpha$ ), 7,45 (dt,  $J=7,6$  e  $0,65$  Hz, 4H, Calc-H-5'), 7,69 (d,  $J=8,8$  Hz, 8H, Calc-H-2 e H-6), 7,71-7,73 (m, 4H, Calc-H-4'), 7,84 (dd,  $J=7,6$  e  $1,59$  Hz, 4H, Calc-H-6'), 7,87 (d,  $J=15,6$  Hz, calc-H- $\beta$ ), 8,95 (s, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3 + \text{TFA}$ )  $\delta$  (ppm): 70,4 (Calc-O $\text{CH}_2$ ); 106,8; 115,6 (Calc-C-3 e C-5); 115,7 (Calc-C-3'); 123,2 (Calc-C- $\alpha$ ); 125,2 (Calc-C-5'); 126,9 (Calc-C-1); 127,5 (Calc-C-2'' e C-6''); 128,4 (Calc-C-4''); 128,7 (Calc-C-3'' e C-5''); 129,4 (C- $\beta$ -pirrólicos), 130,8 (Calc-C-6'); 131,5 (Calc-C-2 e C-6), 133,7 (Calc-C-4'); 135,9 (Calc-C-1''); 145,9 (C- $\alpha$ -pirrólicos); 151,0 (Calc-C- $\beta$ ); 154,3 (Calc-C-2'); 196,8 (Calc-C=O). **RMN de  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3 + \text{TFA}$ )  $\delta$  (ppm): -175,5 (d,  $J=14,1$  Hz, 8F, 5,10,15,20-Ar- F-*m*), 161,6 (d,  $J=14,1$  Hz, 8F, 5,10,15,20-Ar-F-*p*). **UV-Vis**  $\lambda$  max. nm (log  $\epsilon$ ) em DMSO: 413 (5,38), 536 (não calculado), 506 (4,36), 580 (3,87), 633 (não calculado). **EM (FAB $^+$ )**  $m/z$  2214 ( $\text{M}^{+\bullet}$ ), p.f.: 148-150 °C **Análise elementar**: Encontrado (%): C 71,49; H 3,61; N 2,78. Calculado para  $\text{C}_{132}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{F}_{16}$ : C 71,54; H 3,55; N 2,73.

#### **2.5.4- Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona- síntese do derivado **6****

##### *2.5.4.1- Ativação do grupo carboxilo com N-hidroxi-succinimida*

A uma solução de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina (31 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ) em 2 mL de piridina seca foram adicionados 0,1 mL de  $\text{SOCl}_2$  (163 mmol). A mistura reaccional foi mantida protegida da luz e protegida da humidade por um tubo de secagem durante 30 minutos à temperatura ambiente, tempo após o qual se verificou por TLC a conversão completa da porfirina de partida no cloreto de acilo correspondente. Em seguida, procedeu-se à adição de *N*-hidroxi-succinimida (74 mg, 643  $\mu\text{mol}$ ) e a reacção foi

aquecida a 50 °C durante 3 horas. A piridina foi então evaporada e o resíduo retomado em clorofórmio. De seguida, a mistura reaccional foi lavada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, separada a fase orgânica e esta seca através de sulfato de sódio anidro. Após concentração da fase orgânica a pressão reduzida, procedeu-se à sua purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, usando diclorometano como eluente. A fracção contendo material porfirínico foi recolhida e cristalizada numa mistura de diclorometano/éter de petróleo, tendo-se obtido o éster activado **5** com 97% de rendimento.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,02 (s largo, 4H, 2  $\text{CH}_2$ ), 3,99 (s, 9H, 10,15,20- $\text{OCH}_3$ ), 7,78-7,82 (m, 6H, 10,15,20-H-*o*), 8,38 (d,  $J$ = 8,4 Hz, 2H, 5-H-*o*), 8,55 (d,  $J$ = 8,4 Hz, 2H, 5-H-*m*), 8,76 (d,  $J$ = 4,8 Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos).

#### *2.5.4.2.- Acoplamento do éster activado 5 a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona*

A uma solução de 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona (55 mg, 0,167 mmol) em 2 mL de DMSO comercial recém aberto, foram adicionados 150 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . A reacção foi mantida em agitação mecânica, atmosfera de azoto e à temperatura ambiente até se observar alteração da cor da solução de amarelo para rosa. Após este período, procedeu-se à adição de 20,0 mg de éster activado **5** (24,1  $\mu\text{mol}$ ). A mistura reaccional foi mantida no escuro e à temperatura ambiente durante todo o tempo de reacção. Após 1 h 30 min. à temperatura ambiente verificou-se por TLC o consumo total do reagente de partida e a formação de um só produto final, de polaridade inferior ao reagente de partida. A mistura reaccional foi lavada com água destilada e extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi então seca através de sulfato de sódio anidro, concentrada a pressão reduzida e purificada por cromatografia de coluna de sílica gel. A primeira fracção amarela, correspondente à calcona de partida, foi extraída usando uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (2:1). O aumento de polaridade do eluente para uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:1) resultou na separação do único produto da reacção, identificado por RMN e espectrometria de massa como sendo o composto **6** pretendido. O produto final foi cristalizado numa mistura de éter de petróleo/diclorometano com um rendimento final de 97%.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): -2,80 (s, 2H, NH), 3,97 (s, 6H, 10,20-Ar-OCH<sub>3</sub>), 3,99 (s, 3H, 15-Ar-OCH<sub>3</sub>), 4,79 (s, 1H, Calc-CH<sub>2</sub>), 6,92 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, Calc-H-3 e H-5), 6,97-7,09 (m, 5H, Calc-H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''), 7,23 (d,  $J$  = 18,2 Hz, Calc-H- $\alpha$ ), 7,31-7,35 (m, 3H, 10,15,20-Ar-H-*p*), 7,48-7,56 (m, 4H, Calc-H-2, H-6, H-3' e H-5'), 7,60-7,71 (m, 8H, Calc-H- $\beta$ , H-4' e 10,15,20-Ar-H-*m*), 7,75-7,86 (m, 7H, Calc-H-6' e 10,15,20-Ar-H-*o*), 8,25 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 5-Ar-H-*o*), 8,53 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 2H, 5-Ar-H-*m*), 8,68 (d,  $J$  = 4,8 Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,89-8,91 (m, 6H, H- $\beta$ -pirrólicos).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 55,5 (10,15,20-OCH<sub>3</sub>); 69,8 (Calc-OCH<sub>2</sub>); 113,6; 115,3 (Calc-C-3 e C-5); 120,1; 120,3; 120,4; 123,6 (Calc-C- $\alpha$ ); 126,3; 127,2; 127,4 (10,15,20-C-*p*); 127,5 (10,15,20-C-*m*); 127,6 (10,15,20-C-*o*); 127,9; 128,3; 128,6 (5-C-*m*); 130,1 (Calc-C-6'); 130,3 (Calc-C-2 e C-6); 132,5; 132,9; 134,7 (5-C-*o*); 136,0; 143,3; 145,3 (Calc-C- $\beta$ ); 147,8; 148,9 (Porf-5-C-*p*); 157,9 (Porf-C-*m*(C-OCH<sub>3</sub>)); 160,9; 165,9; 166,6 (Porf-C=O); 191,7 (Calc-C=O). **EM (FAB<sup>+</sup>)**  $m/z$  1061 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 749 ( $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ). p.f. > 300 °C. **UV-Vis**  $\lambda$  max. nm (log  $\epsilon$ ) em DMSO: 420 (5,53), 549 (3,76), 589 (3,64), 644 (3,49). **Análise elementar** Encontrado (%) C 78,30; H 5,10; N 5,40; Calculado para C<sub>70</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O: C 77,90; H 5,04; N 5,19.

## **2.5.5- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a derivados de *N*-flavonilglicina**

### *2.5.5.1-Procedimento geral*

A uma solução de porfirina **1** em tolueno foram adicionados paraformaldeído e *N*-flavonilglicina requerida. A reacção foi mantida em refluxo, sob atmosfera de azoto e protegida da luz durante 16 horas. A reacção foi monitorizada por TLC em períodos de 5 horas, tendo sido feitas adições sucessivas de paraformaldeído e *N*-flavonilglicina correspondente nesses períodos. As reacções foram terminadas após lavagem com água e a mistura reaccional foi extraída com  $\text{CHCl}_3$  e seca através de sulfato de sódio anidro. Procedeu-se à evaporação do solvente e o resíduo, após retomado em diclorometano foi



sujeito a cromatografia em coluna de sílica gel usando os eluentes apropriados para cada caso.

*2.5.5.2- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a N-(4-flavonil)glicina 7- síntese do derivado 10*

Esta reacção foi efectuada a partir de uma solução de porfirina **1** (20,4 mg, 20,9  $\mu$ mol) em tolueno (4 mL) de acordo com o procedimento geral. Procedeu-se de seguida à adição de paraformaldeído (5,7 mg, 190  $\mu$ mol) e de *N*-(4-flavonil)glicina **7** (10,6 mg, 35,9  $\mu$ mol). Este último procedimento foi repetido de cinco em cinco horas durante um período total de 16 horas. Após terminar a reacção de acordo com o descrito no procedimento geral, procedeu-se à purificação da mistura reaccional. O resíduo foi retomado em diclorometano e purificado por cromatografia de coluna de sílica gel. A eluição foi iniciada usando uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:1). A primeira fracção rosa foi identificada por TLC como sendo constituída pela porfirina de partida **1** que não reagiu (30%), seguida da fracção verde, a clorina **10** que foi obtida com 57% de rendimento. O aumento da polaridade da mistura reaccional para éter de petróleo/ diclorometano (1:2) permitiu a separação de outras duas fracções de cor rosa, ambas produtos resultantes de bis-adição. A primeira, mais abundante, trata-se da isobacterioclorina **11** e a segunda é constituída pela bacterioclorina **12**.

**Clorina 10:** RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): -1,80 (s, 2H, NH), 3,66-3,70 (m, 2H, H-pirrolidina), 3,93-4,00 (m, 2H, H-pirrolidina), 5,53-5,56 (m, 2H, H-2 e H-3), 6,54 (d,  $J=8,9$  Hz, 2H, H-3''' e H-5'''), 6,61 (s, 1H, H-3''), 7,34 (t,  $J=8,1$  Hz, 1H, H-6''), 7,44 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H, H-8''), 7,61 (dt,  $J=8,1$  e 1,5 Hz, 1H, H-7''), 7,73 (d,  $J=8,9$  Hz, 2H, H-2''', H-6'''), 8,15 (dd,  $J=8,1$  e 1,5 Hz, 1H, H-5''), 8,43 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,49 (s, 2H, H-12 e H-13), 8,74 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 51,5 (C-2 e C-3); 54,6 (C-2' e C-3'); 96,6, 105,1 (C-3''); 106,6; 113,5 (C-3''' e C-5'''); 117,8 (C-8''); 120,7; 123,9 (C- $\beta$ -pirrólico); 124,0 (C-6''); 124,9 (C-5''); 125,6 (C-2''' e C-6'''); 127,7 (C- $\beta$ -pirrólico); 128,2 (C- $\beta$ -pirrólico); 132,6 (C-7''); 133,3; 135,4; 140,3; 149,3 (C-12 e C-13); 153,0; 156,1; 163,6; 168,2; 178,3 (C=O (C-4'')). RMN  $^{19}\text{F}$

(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): -184,93 a -184,75 (m, 4F, Ar-F-*m*), -183,31 (dt, 2F, *J*= 21,8 Hz e 8,4 Hz, Ar-F-*m*), -182,87 (dt, 2F, *J*= 21,8 e 8,4 Hz, Ar-F-*m*), -174,95 (t, 2F, *J*= 20,9 Hz, Ar-F-*p*), -173,78 (t, 2F, *J*= 21,8 Hz, Ar-F-*p*), -160,53 a -160,26 (m, 6F, Ar-F-*o*), -158,43 (dd, 2F, *J*= 21,8 e 5,8 Hz, Ar-F-*o*). **EM (FAB<sup>+</sup>):** *m/z* 1237 (M<sup>+</sup>), 975 ([M+H]<sup>+</sup>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N-flavona, 17%). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 406 (100%), 503 (13%), 598 (7%), 651 (27%).

**Isobacterioclorina 11:** **EM (FAB<sup>+</sup>):** *m/z* 1502 ([M+H]<sup>+</sup>). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 385 (100%), 506 (24%), 533 (6%), 591 (8%), 721 (55%).

**Bacterioclorina 12** **EM (FAB<sup>+</sup>):** *m/z* 1502 ([M+H]<sup>+</sup>). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) 385 (100%), 506 (15%), 533 (22%), 591 (27%), 633 (10%).

#### 2.5.5.3- *Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a N-(3-flavonil)glicina 8- síntese do derivado 13*

Esta reacção foi efectuada a partir de uma solução de porfirina **1** (20,8 mg, 21,3  $\mu$ mol) em tolueno (4 mL) de acordo com o procedimento geral. Procedeu-se de seguida à adição de paraformaldeído (6,5 mg, 220  $\mu$ mol) e de *N*-(3-flavonil)glicina **8** (10,2 mg, 34,6  $\mu$ mol). Após terminar a reacção de acordo com o descrito no procedimento geral, a mistura reaccional foi retomada em diclorometano e purificada por cromatografia de coluna de sílica gel. A eluição foi iniciada usando uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:1). A primeira fracção rosa foi identificada por TLC como pertencente à porfirina de partida que não reagiu (35%), seguida da clorina **13**, o produto maioritário da reacção (53%). Uma segunda fracção rosa separada usando uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:2) e revelou ser constituída por uma mistura de produtos resultantes da adição de duas moléculas de dipolo: a isobacterioclorina **14**, mais abundante, e a bacterioclorina **15**.

**Clorina 13:** **RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): -1,81 (s, 2H, NH), 3,66-3,71 (m, 2H, H-pirrolidina), 3,91-3,97 (m, 2H, H-pirrolidina), 5,51-5,53 (m, 2H, H-2, H-3), 6,64 (dd, *J*= 7,9 e 1,8 Hz, 1H, H-3''), 6,70 (s, 1H, H-3''), 7,10- 7,28 (m, 3H, H-2'', H-4'' e H-6''), 7,42 (t, *J*= 7,5 Hz, 1H, H-6''), 7,56 (d, *J*= 8,3 Hz, 1H, H-8''), 7,75 (ddd, *J*= 8,3, 7,5 e 1,6

Hz, 1H, H-7''), 8,20 (dd,  $J=7,5$  e  $1,6$  Hz, 1H, H-5''), 8,45 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,49 (s, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,75 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 51,6 (C-2 e C-3); 55,2 (C-2' e C-3'); 96,7; 106,5; 107,6 (C-3''); 111,4; 116,5; 116,9; 117,8 (C-8''); 123,9 (C- $\beta$ -pirrólico); 125,2 (C-6''); 125,3 (C-5''); 128,2 (C- $\beta$ -pirrólico); 129,0; 129,8; 132,5 (C- $\beta$ -pirrólico); 132,6 (C-7''); 133,8; 135,3; 140,4; 147,6; 152,9; 156,2; 163,3 (C-1'''); 168,6 (C-5'''); 178,4 (C=O (C-4'')). **RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): -184,87 (dt, 2F,  $J=21,5$  e  $8,2$  Hz, Ar-F-*m*), -183,67 (dt, 2F,  $J=22,9$  e  $8,6$  Hz, Ar-F-*m*), -182,86 (dt, 2F,  $J=22,9$  e  $6,7$  Hz, Ar-F-*m*), -175,01 (t, 2F,  $J=21,5$  Hz, Ar-F-*p*), -173,92 (t, 2F,  $J=22,9$  Hz, Ar-F-*p*), -160,47 (dd, 2F,  $J=22,9$  e  $8,6$  Hz, Ar-F-*o*), -160,36 a -160,28 (m, 4F, Ar-F-*o*), -158,49 (dd, 2F,  $J=22,9$  e  $6,7$  Hz, Ar-F-*o*). **EM ( $\text{FAB}^+$ ):**  $m/z$  1238 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 975 ( $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_2\text{H}_4\text{N-flavona}$ , 17%); **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 404 (100%), 503 (14 %), 597 (7%), 651 (30%).

**Isobacterioclorina 14:** **EM ( $\text{FAB}^+$ ):**  $m/z$  1502 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 384 (100%), 508 (24%), 534 (7%), 592 (8%), 725 (57%).

**Bacterioclorina 15:** **EM ( $\text{FAB}^+$ ):**  $m/z$  1502 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 385 (100%), 508 (17%), 532 (22%), 592 (28%), 633 (10%).

#### 2.5.5.4- Acoplamento de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a *N*-(4-flavonil)glicina 9- síntese do derivado 16

Esta reacção foi efectuada a partir de uma solução de porfirina **1** (20,8 mg, 21,3  $\mu\text{mol}$ ) em tolueno (4 mL) de acordo com o procedimento geral. Procedeu-se de seguida à adição de paraformaldeído (6.5 mg, 220  $\mu\text{mol}$ ) e de *N*-(3-flavonil)glicina **9** (10,2 mg, 34,6  $\mu\text{mol}$ ). O resíduo foi retomado em diclorometano e cromatografado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:1). A primeira fracção rosa foi identificada por TLC como pertencente à porfirina de partida **1** que não reagiu (71%). A clorina **16**, produto maioritário da reacção (22%), foi separada usando diclorometano como eluente.

**Clorina 16:** **RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): - 1,79 (s, 2H, NH), 3,66-3,71 (m, 2H, H-pirrolidina), 3,89-3,94 (m, 2H, H-pirrolidina), 5,51-5,53 (m, 2H, H-2, H-3), 6,50 (d,  $J=$

8,6 Hz, H-3'''), 6,63 (s, 1H, H-3''), 7,07- 7,33 (m, 3H, H-2''', H-4''' e H-5'''), 7,43 (t,  $J=7,9$  Hz, 1H, H-6''), 7,56 (d,  $J=7,9$  Hz, 1H, H-8''), 7,75 (t,  $J=7,9$  Hz, 1H, H-7''), 8,20 (d,  $J=7,9$  Hz, 1H, H-5''), 8,45 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,49 (s, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos), 8,75 (d,  $J=4,9$  Hz, 2H, H- $\beta$ -pirrólicos). **RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): -184,87 (dt, 2F,  $J=21,5$  e 8,2 Hz, Ar-F-*m*), -183,67 (dt, 2F,  $J=22,9$  e 8,6 Hz, Ar-F-*m*), -182,86 (dt, 2F,  $J=22,9$  e 6,7 Hz, Ar-F-*m*), -175,01 (t, 2F,  $J=21,5$  Hz, Ar-F-*p*), -173,92 (t, 2F,  $J=22,9$  Hz, Ar-F-*p*), -160,47 (dd, 2F,  $J=22,9$  e 8,6 Hz, Ar-F-*o*), -160,36 a -160,28 (m, 4F, Ar-F-*o*), -158,49 (dd, 2F,  $J=22,9$  e 6,7 Hz, Ar-F-*o*). **EM (FAB $^+$ )**:  $m/z$  1238 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 975 ( $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_2\text{H}_4\text{N-flavona}$ , 15%). **UV-Vis**  $\lambda$  nm (int.rel.) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 404 (100%), 503 (14%), 597 (7%), 651 (29%).

## 2.6- Referências

1. Pietta, PG, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63: 1035.
2. Depeint, F, Gee, JM, Williamson, G, Johnson, IT, *Proceedings of the Nutrition Society* **2002**, 61: 97.
3. Ren, W, Qiao, Z, Wang, H, Zhu, L, Zhang, L, *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23: 519.
4. Boumendjel, A, Pietro, A, Dumontet, C, Barron, D, *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22, 512.
5. Fereidoon, S, NaczK, M, "Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications", editado por Technomic Publishing Company, Inc., 1995.
6. Handbook of Antioxidants editado por Enrique Cadenas, Lester Packer, Marcel Dekker Inc., New York, 1997.
7. Pouget, C, Lauthier, F, Simon, A, Fagnere,C, Basly, JP, Delage, C, Chulia, AJ, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11: 3095.
8. Pouget, C, Fagnere,C, Basly, JP, Besson, AE, Champavier, Y, Habrioux, G, Chulia, AJ, *Pharm. Res.*, **2002**, 19: 286.
9. Brancalion, L, Moseley, H, *Lasers. Med. Sci.*, **2002**, 17:173.
10. Bonnett, R, "Chemical Aspects of Photodynamic Therapy" editado por Gordon and Breach, Londres, 2000.
11. Cavaleiro, JAS, Neves, MGMS, Tomé, AC, *Arkivoc*, **2003**, (xiv): 107.
12. Kumadaki, I, Ando, A, Omote, M, *J. Fluor. Chem.*, **2001**, 109: 67.

13. Pandey, SK, Gryshuk, AL, Ohkubo, K, Fukusumi, S, Doblach, MP, Zheng, G, Ou, Z, Kadish, KM, Oseroff, A, Ramaprasad, S, Pandey, RK, *Tetrahedron*, **2003**, 59:10059.
14. Ando, A, Kumadaki, I, *J. Fluor. Chem.*, **1999**, 100: 135.
15. Islas, I, Alvarez, MG, Marty, C, Mori, G, Durantini, EN, Rivarola, V, *Toxicology*, **2000**, 149: 69.
16. La Penna, M, Alvarez, MG, Yslas, EI, Rivarola, V, Durantini, EN, *Bioorg. Chem.* **2001**, 29: 130.
17. Milanesio, ME, Alvarez, MG, Yslas, E , Borsarelli, CD. Silber, JJ, Rivarola, V, Durantini, EN, *Photochem. Photobiol.*, **2001**, 74: 14.
18. Faustino, MAF, Neves, MGPMS , Cavaleiro, JAS, Neumann, M, Brauer, HD, Jori, G, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72: 217.
19. Milanesio, ME, Moran, MS, Islas, EI, Alvarez, MG, Rivarola, V, Durantini, EN, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9: 1943.
20. Gonsalves, AMd'AR, Varejão, JMTB, Pereira, MM, *J. Heterocycl. Chem*, **1991**, 28: 635
21. Kadish, KM, Adams, AMc, Han, BC, Franzen, MM, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112: 8364.
22. Battioni, P, Brigaud, O, Desvaux, H, Mansuy, D, Traylor, TG, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32: 2893.
23. Drovetskaya, T, Reed, CA, Boyd, P, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36: 7981.
24. Tomé, AC, Lacerda, PSS, Neves, MGMS, Cavaleiro, JAS, *Chem. Commun.* **1997**: 1199.
25. Silva, AMG, Tomé, AC, Neves, MGMS, Cavaleiro, JAS, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41: 3065.
26. Tomé, AC, Lacerda, PSS, Silva, AMG, Neves, MGMS, Cavaleiro, JAS, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2000**, 4: 532.
27. Silva, AMG, Tomé, AC, Neves, MGPMS, Silva, AMS, Cavaleiro, JAS, *Chem. Commun.*, **1999**, 1767.
28. Silva, AMG, Tomé, AC, Neves, MGMS, Silva, AMS, Cavaleiro, JAS, *J. Org. Chem.* **2005**, 70: 2306.
29. Silva, AMG, Tomé, AC, Neves, MGMS, Silva, AMS, Cavaleiro, JAS, Perrone, D, Dondoni, A, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 43: 603.

30. Flemming, J, Dolphin, D, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43: 7281.
31. Desjardins, A, Flemming, J, Sternberg, ED, Dolphin, D, *Chem. Commun.*, **2002**: 2622.
32. Silva, AMG, Tomé, AC, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, *Synlett*, **2002**: 1155.
33. Li, X, Zhuang, J, Li, Y, Liu, H, Wang, S, Zhu, D, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46: 1555.
34. Heine, HW, Peavy, R, *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 35: 3123.
35. Hall, JH, Huisgen, R, *Chem. Commun.*, **1971**: 1187.
36. Wei, X, Hu, Y, Li, T, Hu, H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1993**, 1, 2487.
37. Gan, L, Zhou, D, Luo, C, Tan, H, Huang, M, Pan, J, Wu, Y, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61: 1954.
38. Kosyrev, AN, Dougherty, T, Pandey, R, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37: 3781.
39. Whitlock, HW, Jr, Hanauer, R, Oester, MY, Bower, BK, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91: 7485.
40. Bonnett, R, Djelal, BD, Hamilton, PA, Martinez, G, Wierrani F, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1999**, 53: 136.
41. Bonnett, R, Martínez, G, *Tetrahedron*, **2001**, 57: 9513.
42. Rotomskis, R, Streckyte, G, Bagdonas, S, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1997, 39: 167.
43. Ericson, MB, Grapengiesser, S, Gudmunson, F, Wennberg, AM, Larko, O, Moan, J, Rosén, A, *Lasers Med. Sci.*, **2003**, 18: 56.
44. Aveline, MA, Basan, T, Redmond, RW, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1995**, 30: 161.
45. Maiti, NC, Mazumdar, S, Periasamy, N, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1998**, 2:369.
46. Mishra, PP, Bhatnagar, J, Datta, A, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 386: 158.
47. Wróbel, D, Hanyz, I, Bartkowiak, R, Ion, RM, *J. Fluor.*, **1998**, 8: 191.



### **Capítulo III**

Síntese e caracterização por espectrometria de massa de porfirinas  
ligadas a aminoácidos

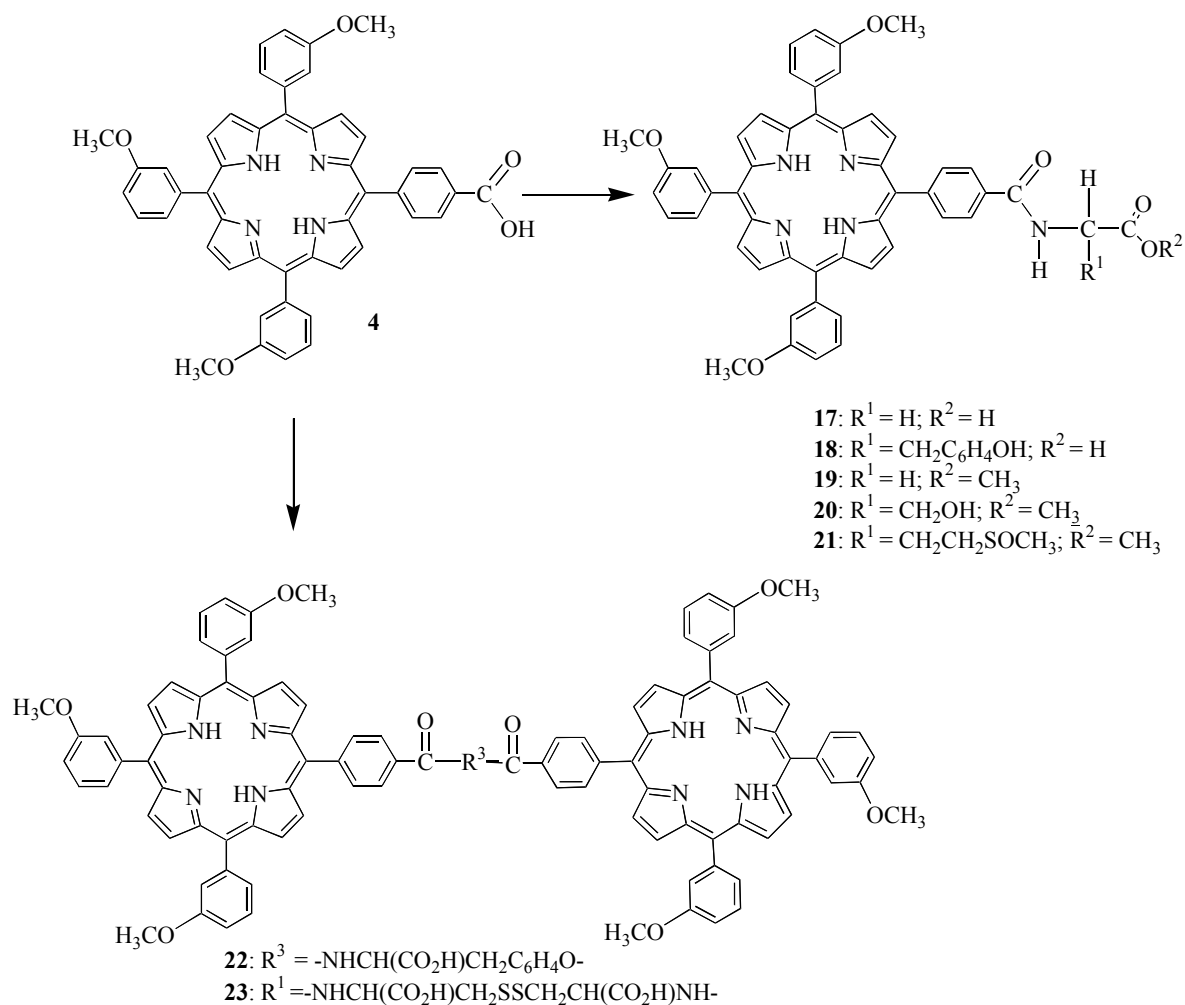




### 3.1- Introdução

No capítulo anterior tivemos a oportunidade de descrever a síntese de porfirinas ligadas a flavonóides e de fazer referência à citotoxicidade e acumulação celular para alguns dos compostos sintetizados. Os resultados obtidos foram animadores, permitindo considerar as moléculas promissoras para o desenvolvimento de estudos futuros com vista à sua aplicação em fotodiagnóstico/diagnóstico de neoplasias. Neste capítulo, foram preparados novos derivados porfirínicos acoplados a aminoácidos naturais e a ésteres metílicos de aminoácidos (Figura 3.1).

O acoplamento de porfirinas a aminoácidos tem sido alvo de diversos estudos ao longo das últimas décadas. Em medicina, estas moléculas têm sido indicadas como agentes bastante específicos na intercalação de DNA<sup>1,2</sup> e também como moléculas com grande afinidade para tecidos tumorais.<sup>3</sup> Estudos recentes revelam ainda que derivados porfirínicos contendo resíduos de polilisina, são eficientes na foto-inativação de estirpes bacterianas, quer Gram-positivas quer Gram-negativas, resistentes a antibióticos.<sup>4</sup>



Esquema 3.1

As moléculas sintetizadas englobam conjugados de tipo porfirina-aminoácido (**17-21**) e diporfirina-aminoácido (**22** e **23**). O derivado **17** resultou do acoplamento da porfirina **4** a glicina e os derivados **18** e **22** a tirosina. Do acoplamento dos ésteres metílicos dos aminoácidos glicina, serina e metionina resultaram os derivados **19**, **20** e **21**, respectivamente. O derivado **23** resultou do acoplamento da porfirina base **4** a cisteína.

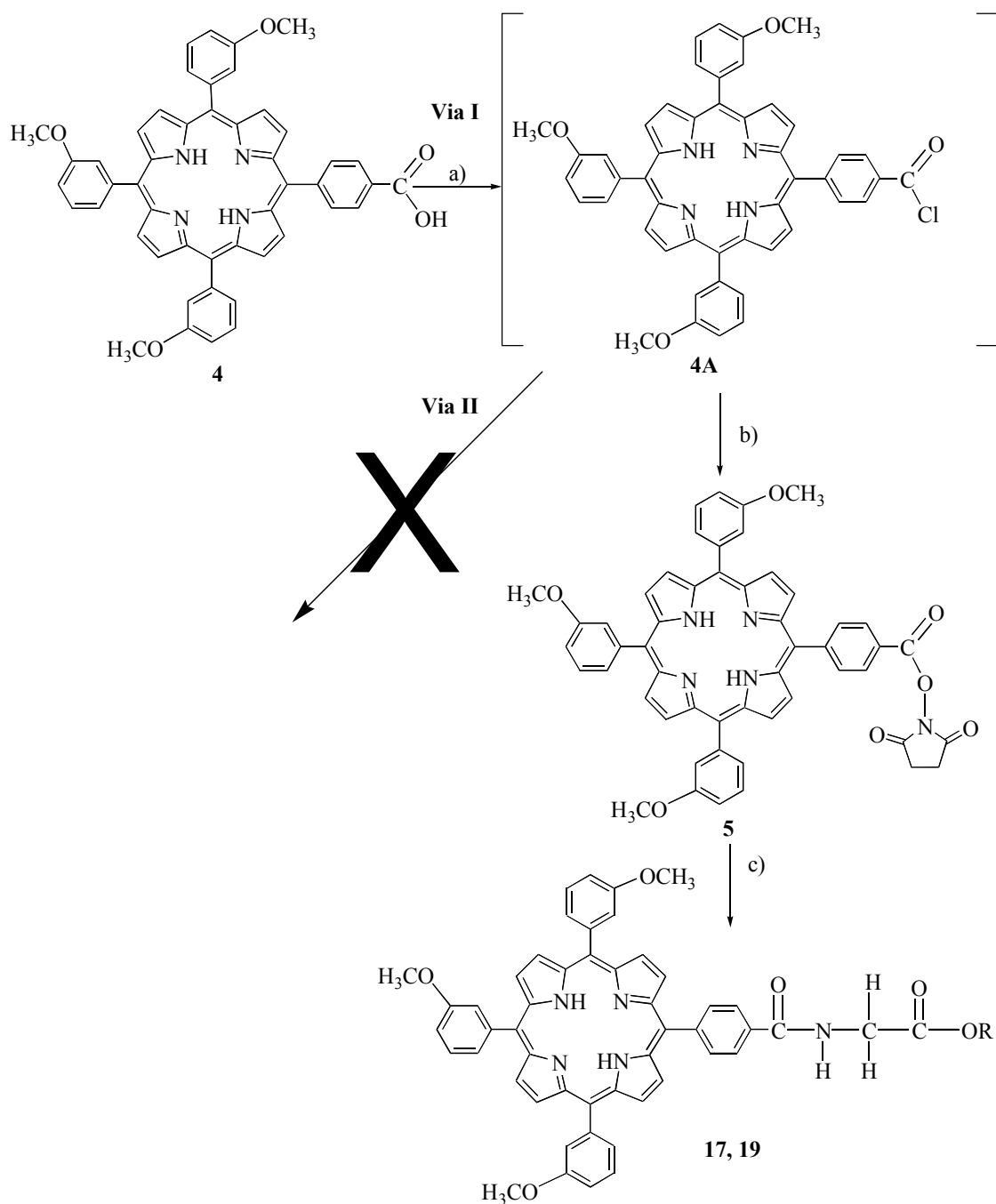
Como é possível analisar pelo Esquema 3.1, a única diferença estrutural existente entre os derivados **17-21** é o resíduo aminoácido associado por uma ligação amida à posição *para* de um dos grupos fenilo da porfirina; além das diferentes cadeias laterais ( $R^1$ ) características de cada aminoácido, o grupo terminal nos derivados **17** e **18** é um grupo carboxilo enquanto que nos derivados **19**, **20** e **21** é um grupo éster.

A caracterização estrutural de cada um dos derivados foi efectuada recorrendo a técnicas espectroscópicas de RMN mono e bidimensional, UV-Vis, espectrometria de massa (em FAB<sup>+</sup> e em Electrospray) e por análise elementar. Foi dada especial atenção à caracterização por espectrometria de massa em Electrospray dado ter-se revelado uma ferramenta valiosa na caracterização estrutural deste tipo de derivados (secção 3.4).

### **3.2- Síntese de porfirinas ligadas a aminoácidos**

#### **3.2.1- Estudo das condições de acoplamento: acoplamento de glicinato de metilo à porfirina 4.**

A primeira tentativa de preparação dos compostos de tipo porfirina-aminoácido foi baseada em métodos estabelecidos na literatura para o acoplamento de macrociclos porfirínicos à polilisina, e que envolve a síntese de um intermediário activado (Esquema 3.2).<sup>4</sup> Este intermediário (**5**) já foi anteriormente preparado aquando do acoplamento da mesma porfirina a 2'-hidroxi-4-benziloxicalcona. Relembrando o procedimento usado para a sua síntese, fez-se reagir a porfirina **4** com SOCl<sub>2</sub> em piridina seca e à temperatura ambiente, mantendo o balão reaccional protegido da humidade por um tubo de secagem. Após 30 minutos, observou-se a conversão completa da porfirina de partida (**4**) no cloreto de acilo correspondente (**4A**), e adicionou-se então a *N*-hidroxi-succinimida. Ao fim de 3 horas a 50 °C, verificou-se por TLC a conversão completa do cloreto de acilo (**4A**) num produto principal de cor rosa. O solvente foi então evaporado a pressão reduzida e, após retomar a mistura reaccional em clorofórmio, esta foi neutralizada por lavagem com uma solução alcalina de hidrogenocarbonato de sódio, extraída em clorofórmio, concentrada e purificada de seguida por cromatografia em coluna de sílica gel, usando diclorometano como eluente (Esquema 3.2).



Via I: a)  $\text{SOCl}_2$ , piridina seca, temperatura ambiente. b) *N*-hidroxi-succinimida,  $50^\circ\text{C}$ . c)  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$  (**17**:  $\text{R}=\text{H}$  (glicina); **19**:  $\text{R}=\text{CH}_3$ ; (glicinato de metilo),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , temperatura ambiente); Via II:  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ .

Esquema 3.2

Uma vez preparado o éster activado **5**, estudámos as condições reaccionais para o acoplamento de aminoácidos. Este estudo foi iniciado com a reacção da porfirina **5** com o glicinato de metilo.

O éster activado **5** foi adicionado a uma solução de glicinato de metilo e  $K_2CO_3$  em DMSO à temperatura ambiente e protegido da humidade por um tubo de secagem. A mistura reaccional foi mantida sob agitação e após 2h e 30min., a reacção foi monitorizada por TLC, verificando-se a conversão completa da porfirina de partida num produto novo, de cor rosa, e num outro em pequena quantidade, que foi identificado como se tratando da porfirina monoácida **4**. De seguida, a mistura reaccional foi neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico e, após extracção com clorofórmio, foi seca através de sulfato de sódio anidro. A purificação foi efectuada por cromatografia em coluna, usando diclorometano como eluente.

A caracterização por RMN de  $^1H$  revelou-se simples e conclusiva quanto à presença do resíduo de aminoácido. Para além dos sinais característicos do macrociclo porfirínico, destaca-se a presença, na zona alifática do espectro, dos sinais característicos do esqueleto aminoácido, que confirmam a estrutura proposta para o derivado **19**: a  $\delta$  3,90 ppm surge um singuleto atribuído à ressonância do grupo metoxilo do glicinato, a  $\delta$  4,44 ppm surge um duplete atribuído à ressonância dos protões de  $CH_2$  ( $J= 4,9$  Hz) e a  $\delta$  6,98 ppm surge um triplete ( $J= 4,9$  Hz) atribuído à ressonância do protão do grupo amida.

Relativamente ao espectro de massa em  $FAB^+$ , destaca-se a presença de dois iões que confirmam o referido acoplamento, a  $m/z$  820 e a  $m/z$  704. O primeiro corresponde ao ião molecular  $[M+H]^+$  e o segundo ao ião  $[M+H]^+-C_4H_6O_3N$ , obtido por clivagem homolítica da ligação carbono-carbono da posição *para* do anel fenilo substituído, com perda de CO e do esqueleto aminoácido.

Após cristalização usando uma mistura de diclorometano/éter de petróleo, o derivado **19** foi obtido com um rendimento de 93%.

Apesar do bom rendimento obtido, decidimos tentar sintetizar este derivado segundo uma metodologia que envolvesse a adição de glicinato de metilo logo após a formação do cloreto de acilo (**4A**) (Esquema 3.2- Via II). No entanto, verificou-se que não ocorria reacção, provavelmente devido à baixa solubilidade deste aminoácido no solvente usado.

Uma vez que a reacção com o glicinato de metilo foi bem sucedida, efectuámos o acoplamento dos restantes aminoácidos segundo o mesmo procedimento experimental.

### 3.2.2- Acoplamento de outros aminoácidos a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina

#### 3.2.2.1- Acoplamento de glicina

A reacção com glicina ocorreu de forma semelhante à reacção com o glicinato de metilo, com formação de apenas um produto final de cor rosa (derivado **17**) e de uma pequena quantidade de porfirina **4**. A reacção foi terminada segundo o procedimento descrito anteriormente. Após evaporação do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi retomado em clorofórmio com 5% de metanol e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. A primeira fracção rosa foi separada usando como eluente clorofórmio com 5% de metanol e foi identificada por TLC como sendo constituída pela porfirina monoácida **4**. O aumento da polaridade do eluente para uma mistura de diclorometano com metanol a 10%, resultou na separação do derivado pretendido **17**, com um rendimento de 85%.

A caracterização estrutural por RMN de  $^1\text{H}$  deste derivado não foi conclusiva relativamente à atribuição dos sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons quer do núcleo porfirínico quer do resíduo aminoácido acoplado, provavelmente devido a efeitos de agregação nos solventes testados.

A análise do espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta, além do ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  806, um outro ião de abundância relativa inferior a  $m/z$  704, correspondente a  $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}_3$ . Este ião fragmento já havia sido encontrado no espectro de  $\text{FAB}^+$  do derivado **19** e é obtido, de forma análoga, por clivagem homolítica da ligação carbono-carbono da posição *para* do fenilo substituído (com perda de CO e do esqueleto aminoácido acoplado).

## 3.2.2.2- Acoplamento de tirosina

A reacção de acoplamento da tirosina à porfirina **4** foi efectuada de forma análoga à reacção de síntese do derivado **19**. O controlo por TLC da reacção entre este aminoácido e o éster activado **5**, após 2 h e 30 min. nas condições reacionais mencionadas, revelou a formação de dois compostos de cor rosa de igual importância.

A reacção foi então terminada por neutralização com uma solução aquosa de ácido cítrico e posterior lavagem com água destilada. A mistura reaccional foi extraída em clorofórmio e seca através de sulfato de sódio anidro. Após remoção do solvente a pressão reduzida, procedeu-se à separação dos componentes da mistura reaccional por recurso a cromatografia em coluna e usando como eluente uma mistura de clorofórmio com 5% de metanol, tendo-se recolhido as duas fracções separadamente.

Uma vez que a tirosina é um aminoácido que apresenta três grupos funcionais (grupos amino, hidroxilo e carboxilo), pensámos inicialmente que os dois produtos maioritários poderiam tratar-se dos isómeros indicados na Figura 3.1, dada a maior reactividade dos grupos amino e hidroxilo.

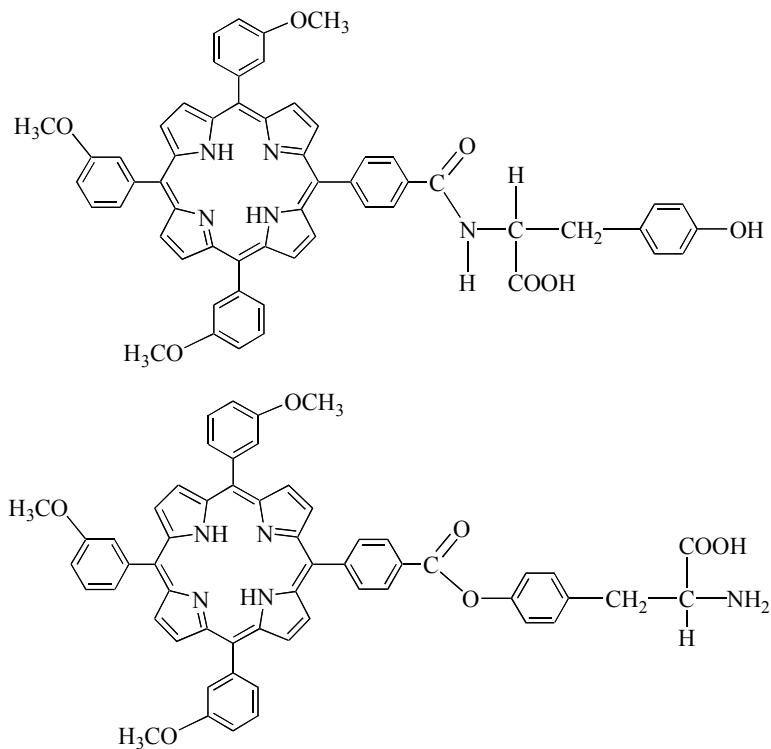


Figura 3.1- Estruturas dos possíveis isómeros resultantes do acoplamento da tirosina à porfirina **4**.



As frações purificadas foram então sujeitas a análise por RMN de  $^1\text{H}$ , espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$ , UV-Vis e análise elementar.

O composto mais polar, obtido com um rendimento de 51%, revelou tratar-se do derivado **18**.

A identificação de todos os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **18** apenas foi possível, mais uma vez, recorrendo a técnicas espectroscópicas de RMN bidimensional (COSY, HSQC e HMBC). Destacam-se os sinais referentes ao resíduo aminoácido que confirmam o seu acoplamento ao macrociclo porfirínico segundo a estrutura proposta (Figura 3.2). Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  facilmente se distinguem os sinais correspondentes à ressonância dos prótons aromáticos da tirosina que surgem sob a forma de dois dupletos com  $J = 8,1$  Hz a  $\delta$  6,69 ppm e a  $\delta$  7,18 ppm devido à ressonância, respectivamente, de  $\text{H-4}'''$ ,  $\text{H-6}'''$  e de  $\text{H-3}'''$  e  $\text{H-7}'''$ . Com o auxílio da análise do espectro de HSQC foi possível identificar os sinais gerados pela ressonância dos carbonos  $\text{C-3}'''$ , e  $\text{C-7}'''$  que surge a  $\delta$  130,3 ppm, e  $\text{C-4}'''$  e  $\text{C-6}'''$  a  $\delta$  114,8 ppm. O espectro de HMBC permitiu a atribuição inequívoca do sinal correspondente à ressonância do próton do grupo hidroxilo a  $\delta$  9,19 ppm, devido à existência de acoplamento a longa distância ( $^3J$ ) entre este e o sinal de  $\text{C-4}'''$  e  $\text{C-6}'''$ .

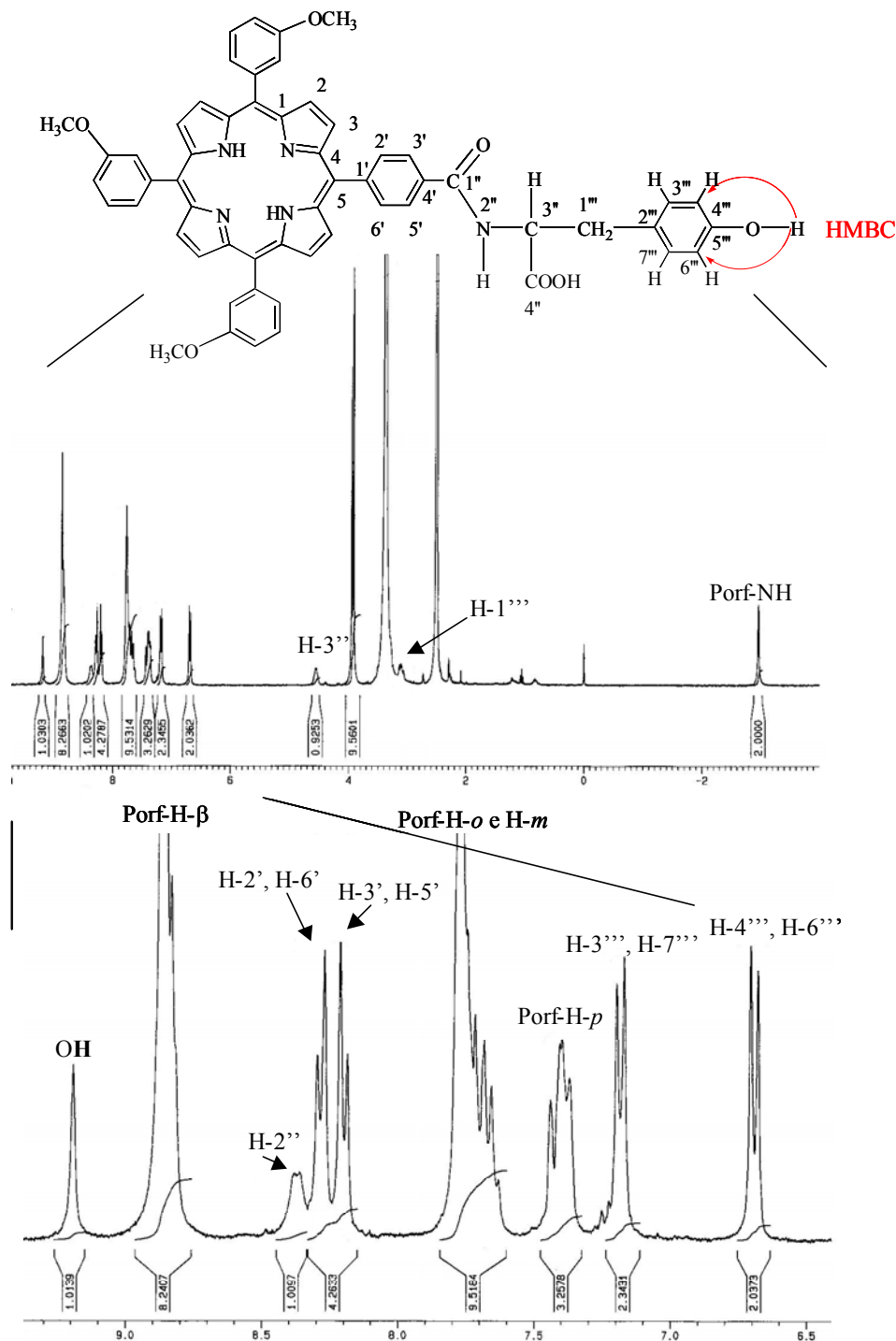


Figura 3.2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **18**.

Os sinais devidos à ressonância de H-1''' e de H-3'' surgem na zona alifática do espectro sob a forma de multipletos a  $\delta$  3,07- 3,18 e 4,55- 4,58 ppm, respectivamente. O sinal correspondente à ressonância de H-2'' (CONH) surge na forma de um duplete largo a  $\delta$  8,37 ppm ( $J$ = 5,6 Hz). O sinal do próton do grupo carboxilo do esqueleto

aminoácido não surge no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  adquirido. Relativamente ao espectro de  $^{13}\text{C}$  destaca-se o sinal devido à ressonância do carbono da ligação amida (C-1'') a  $\delta$  165,5 ppm.

A entrada de uma molécula de tirosina foi também confirmada pelo espectro de massa em  $\text{FAB}^+$ , o qual apresenta um ião a  $m/z$  912 correspondente a  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e um outro ião a  $m/z$  704 que corresponde à perda já referida do aminoácido e de CO.

Relativamente à fracção menos polar obtida, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não foi conclusivo quanto à sua elucidação estrutural, nomeadamente no que se refere à atribuição dos sinais obtidos aos respectivos núcleos. Este facto poderá estar relacionado com a baixa solubilidade nos solventes testados ( $\text{CDCl}_3$ , DMSO deuterado e mistura de  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ). No entanto, o espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta um ião a  $m/z$  1643 que é indicativo de duas porfirinas acopladas ao resíduo aminoácido, apontando para a estrutura **22**; o ião observado a  $m/z$  704, que constitui o pico base do espectro, pode ser justificado como anteriormente pela perda de CO e do substituinte na posição *para*.

Os resultados obtidos por electrospray confirmam estarmos perante o derivado **22** e serão discutidos na secção 3.4.

Assim, a reacção do éster activado **5** com o aminoácido tirosina, origina o conjugado de tipo porfirina-aminoácido **18** e o conjugado de tipo diporfirina-aminoácido **22** (Figura 3.3).

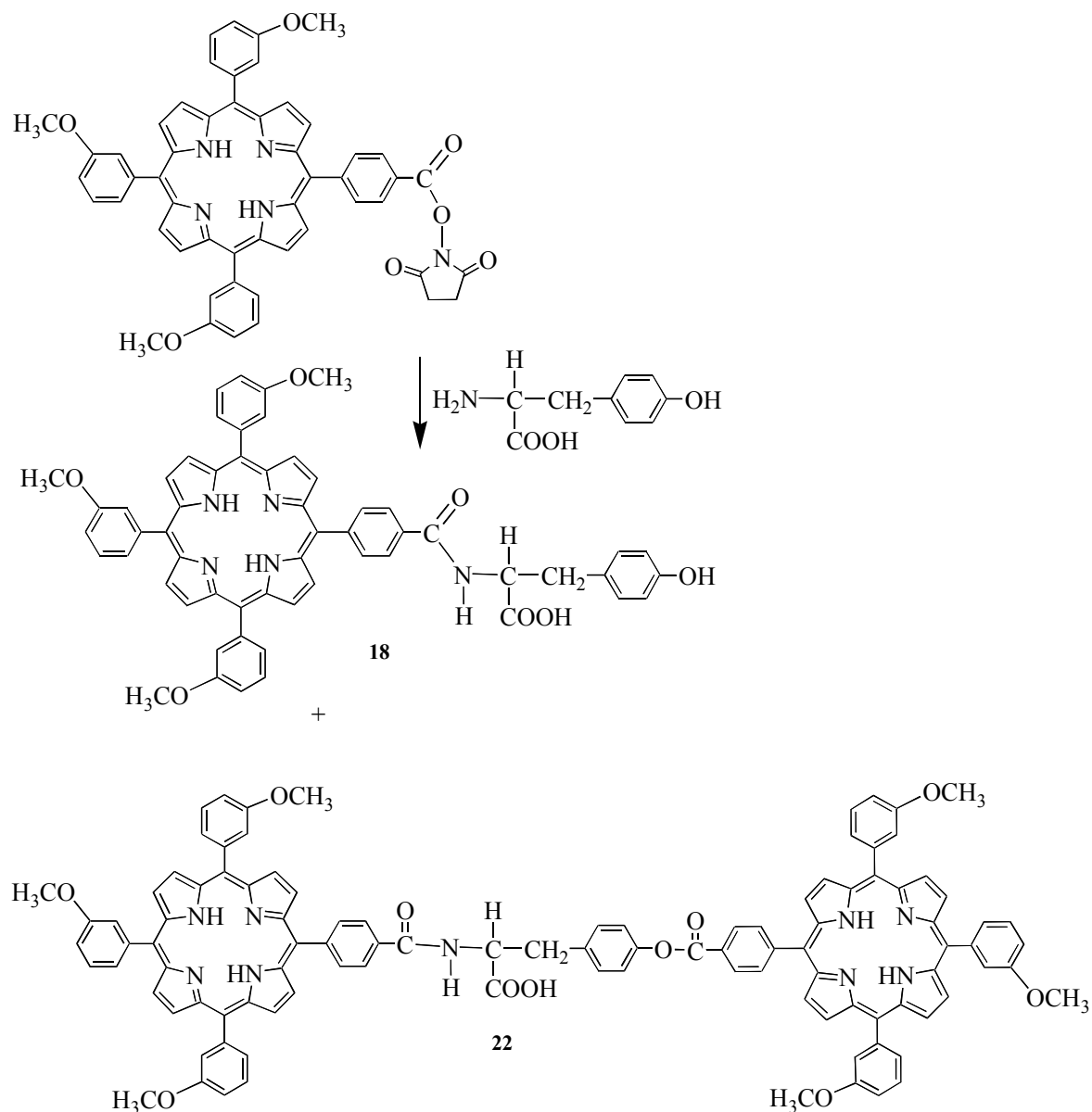


Figura 3.3- Produtos obtidos na reacção de acoplamento do éster activado **5** a tirosina em DMSO e à temperatura ambiente.

#### 3.2.2.4- Acoplamento de serinato de metilo

No caso em que a reacção teve lugar com o serinato de metilo segundo as condições experimentais descritas anteriormente, verificou-se por TLC a formação de dois produtos de cor rosa, sendo a fracção maioritária a correspondente ao composto mais polar (menor  $R_f$ ). A reacção foi terminada de acordo com o procedimento descrito nos casos anteriores. A purificação da mistura reaccional foi efectuada por TLC preparativa usando

tolueno como eluente. A caracterização estrutural da fração majoritária, efectuada por RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC), espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$ , espectroscopia de UV-Vis e por análise elementar, revelou tratar-se do composto **20**. Devido à baixa quantidade de produto obtida, a fração minoritária foi apenas caracterizada por espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$ , estando de acordo com a estrutura proposta para o composto **24** (Figura 3.5).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a fração majoritária, apresenta-se um pouco mais complexo do que no caso do derivado **19**, devido à maior complexidade da cadeia lateral  $\text{R}^1$  deste aminoácido. Também neste caso, e em adição aos sinais típicos do macrociclo porfirínico, observam-se os sinais característicos do esqueleto aminoácido. O multiplete na zona alifática do espectro a  $\delta$  4,22-4,25 ppm, que integra para dois prótons, é gerado pela ressonância dos prótons do grupo  $\text{CH}_2$  do aminoácido. Os restantes sinais devidos à ressonância dos prótons do resíduo aminoácido só foram atribuídos de forma inequívoca mediante a aquisição de espectros de RMN bidimensional, nomeadamente COSY (Figura 3.4).

A existência de correlação observada no espectro de COSY entre o multiplete originado pelos prótons do grupo  $\text{CH}_2$  e os multipletos a  $\delta$  2,58-2,61 ppm e a  $\delta$  5,07-5,10 ppm, permite inferir que estes são gerados pela ressonância dos prótons  $\text{CH}$  e  $\text{OH}$ . No entanto, e como é possível verificar pela análise do mesmo espectro, este é o único acoplamento apresentado pelo multiplete a  $\delta$  2,58-2,61 ppm, pelo que concluímos que este sinal é devido à ressonância do próton do grupo hidroxilo; desta forma, o sinal devido à ressonância de  $\text{CH}$  é o multiplete que surge a  $\delta$  5,07-5,10 ppm. Este multiplete apresenta outra correlação com um duplete atribuído à ressonância do próton do grupo amida a  $\delta$  7,44 ppm ( $J = 7,1$  Hz). Estas atribuições foram também confirmadas pela análise dos espectros de HMBC e de HSQC e estão de acordo com a estrutura proposta para o derivado **20**.

O espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  deste derivado apresenta, como ião molecular, o ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  850. Também neste caso, o espectro de  $\text{FAB}^+$  apresenta, além do ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , um outro ião, de abundância relativa inferior. O último surge a  $m/z$  703 e corresponde à clivagem homolítica da ligação carbono-carbono da posição *para* do fenilo acoplado ao aminoácido, está associada neste caso, à migração de um próton para o fragmento neutro.

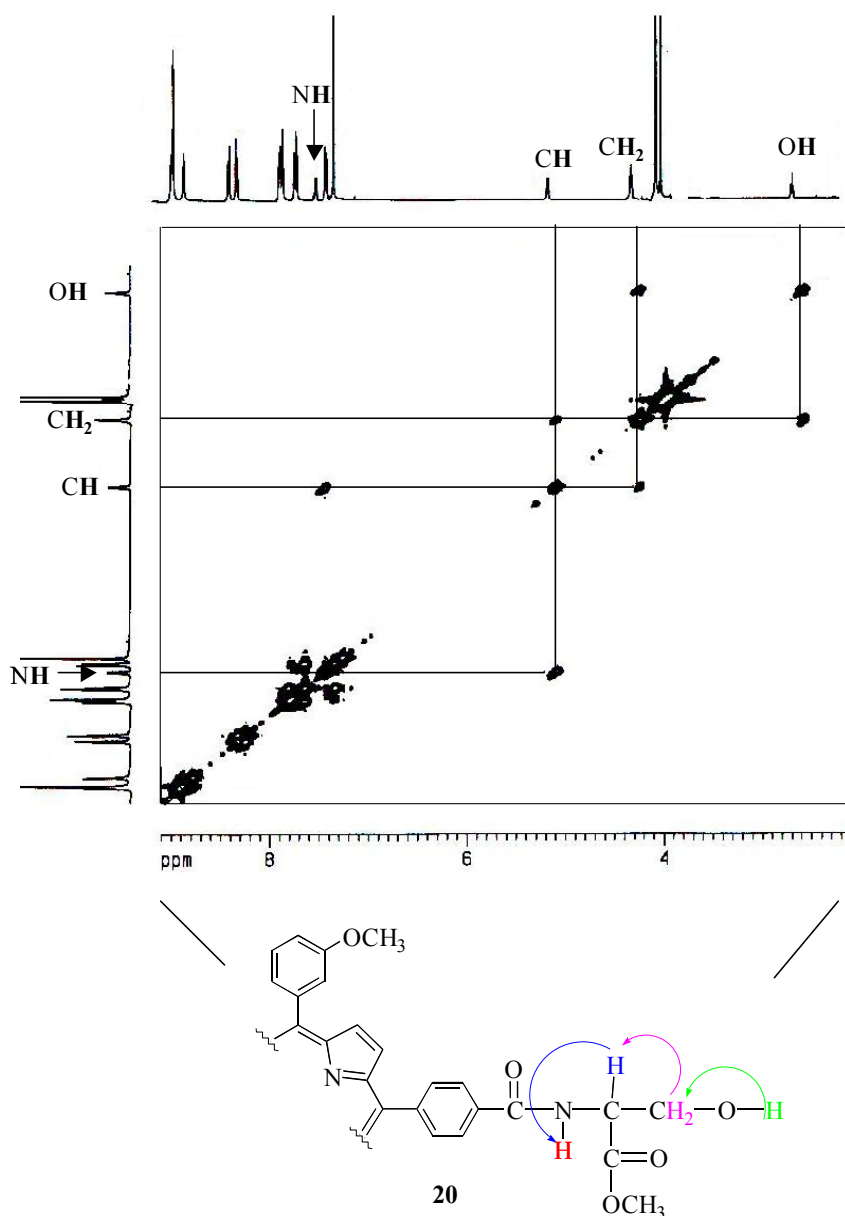


Figura 3.4- Espectro de COSY do derivado **20**.

Conforme já foi referido, a fracção minoritária foi apenas caracterizada por espectrometria de massa, dada a pequena quantidade que foi obtida. Assim, o espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  desta fracção, apresenta um ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  832, menos 18 Da do que o derivado **20**, o que sugere a ocorrência, nas condições reaccionais usadas, de uma ciclização seguida de desidratação, dando origem ao composto **24** de acordo com o mecanismo proposto na Figura 3.5.

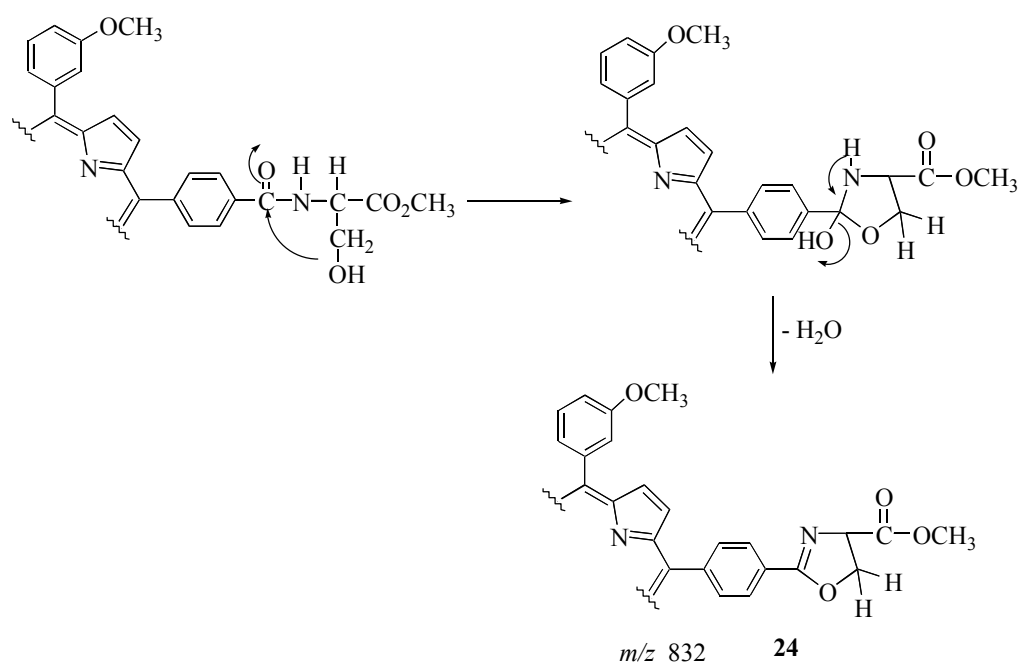
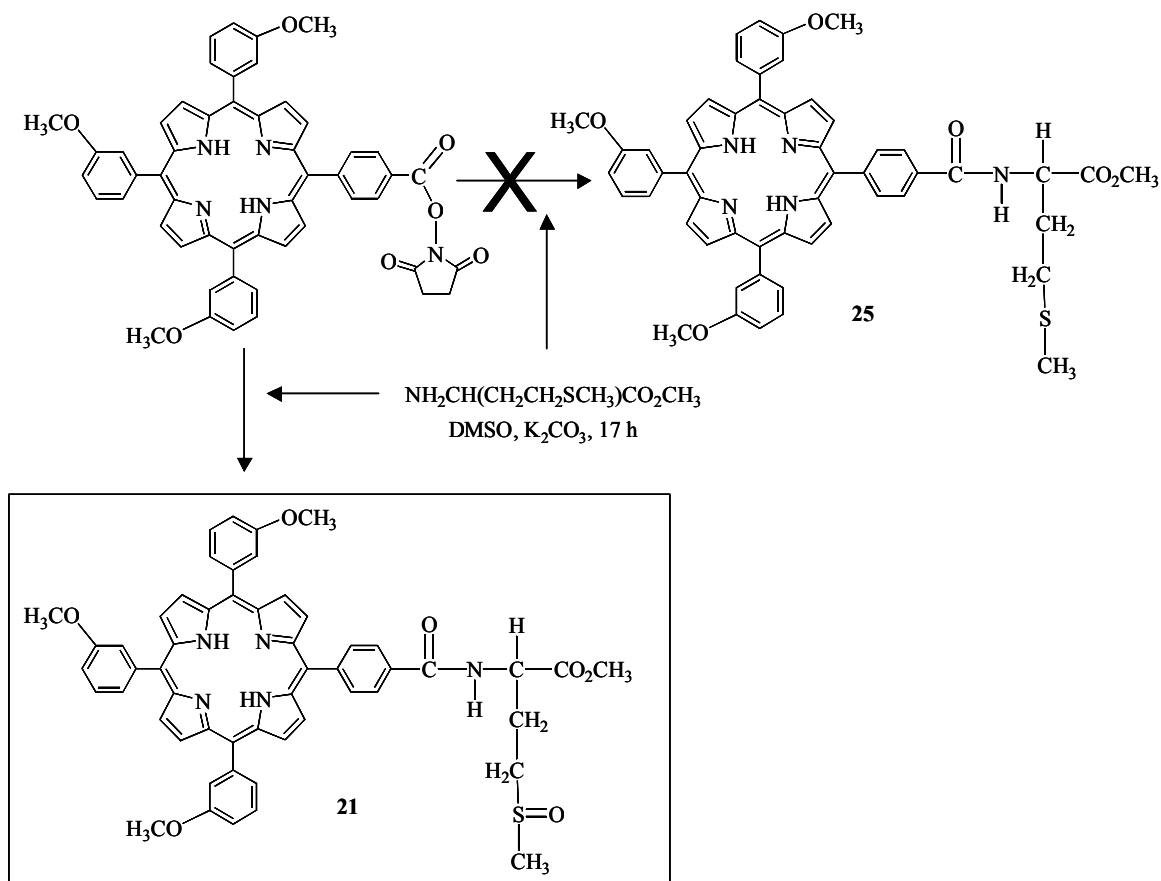


Figura 3.5- Possível estrutura e proposta mecanística para a formação do produto minoritário (**24**) obtido na reacção de acoplamento da porfirina **5** a serinato de metilo.

#### 3.2.2.5- Acoplamento de metioninato de metilo

A reacção de acoplamento de metioninato de metilo à porfirina **5** não conduziu, nas condições experimentais descritas anteriormente, à síntese do derivado pretendido **25**, mas sim ao correspondente composto oxidado **21** (Esquema 3.3). Este composto, foi obtido com um rendimento de 90%, após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo.



Esquema 3.3- Derivados esperado (**25**) e obtido (**21**) na reacção de acoplamento da porfirina **5** ao metioninato de metilo.

A primeira evidência da síntese de um produto oxidado surgiu após a análise do espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  do produto maioritário desta reacção. Ao contrário do esperado ião molecular a  $m/z$  894, o espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta o ião a  $m/z$  910, ou seja, um ião com um valor de  $m/z$  acrescido em 16 unidades de massa. Também neste caso, e à semelhança dos espectros de massa em  $\text{FAB}^+$  do derivado sintetizado anteriormente, verifica-se a presença de um outro ião a  $m/z$  703, correspondente à perda do substituinte em posição *para* do anel benzénico da porfirina. Este fragmento confirma que a reacção de oxidação acontece no esqueleto aminoácido acoplado.

Relativamente à análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , os sinais devidos à ressonância dos prótons do aminoácido (Figura 3.6) são facilmente distinguíveis na zona alifática deste espectro, tendo em conta a multiplicidade e o valor de integração do sinal. Assim, os quatro multipletos que integram cada um deles para um próton e que surgem a  $\delta$  2,38-2,54, 2,84-2,92, 2,95-3,01 e 3,03-3,13 ppm, são devidos à ressonância dos prótons alifáticos da



cadeia  $R^1$  do aminoácido (H-1''', H-2'''). A  $\delta$  2,66 ppm surge um singuleto atribuído à ressonância dos prótons H-4''' e a  $\delta$  3,91 ppm surge outro singuleto, que integra para três prótons, gerado pela ressonância dos prótons do grupo metoxilo do aminoácido (H-6''). O multiplete a  $\delta$  5,07-5,09 ppm, cujo sinal integra para um próton, é atribuído à ressonância de H-3''. Finalizando, a ressonância do próton H-2'' surge na forma de um duplete a  $\delta$  7,88 ppm ( $J = 7,0$  Hz).

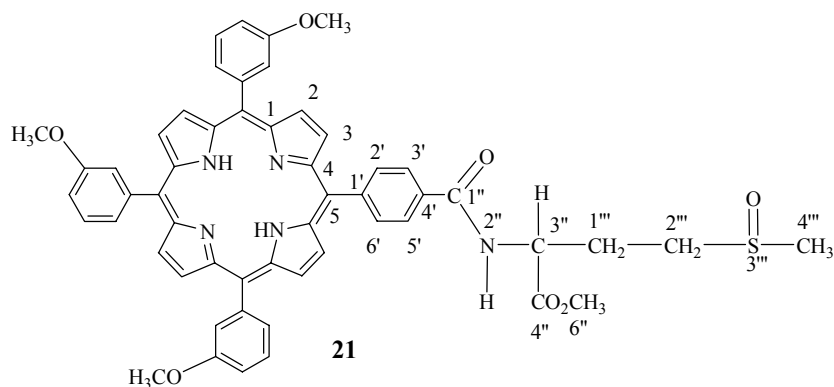


Figura 3.6- Estrutura proposta para o derivado **21**.

#### 3.2.2.6- Acoplamento de cisteína

Quando se utilizou o aminoácido cisteína para acoplamento, utilizando o procedimento experimental habitual, verificou-se o consumo do éster activado **5** e a formação de um produto maioritário de cor rosa. No entanto, este produto novo obtido revelou-se insolúvel em todos os solventes orgânicos usuais, o que impossibilitou não só a sua manipulação e purificação, como também a sua caracterização recorrendo às técnicas normalmente usadas, nomeadamente as técnicas espectroscópicas de RMN e de UV-Vis. Neste caso, a espectrometria de massa em electrospray foi a técnica que permitiu a caracterização do derivado **23**. Este assunto será abordado em pormenor na secção 3.4.

### **3.3- Caracterização por espectrometria de massa de derivados de porfirina acoplados a aminoácidos**

#### **3.3.1- Espectrometria de massa: considerações gerais**

Durante as últimas décadas, a espectrometria de massa tem-se revelado uma técnica analítica de elevado interesse ao nível da investigação científica, devido à elevada precisão/exactidão apresentada na determinação da massa molecular de diversos compostos. Por outro lado, o estudo da fragmentação dos iões observados permite obter informação sobre a estrutura de um composto.

O princípio básico da espectrometria de massa baseia-se na identificação e análise da razão massa/carga ( $m/z$ ) de iões em fase gasosa.

Os espectrómetros de massa são constituídos por três componentes principais: a fonte de ionização, o analisador e o detector. A fonte de ionização é, tal como o nome indica, o componente responsável pela produção de iões do analito em fase gasosa. O analisador é o componente responsável pela separação dos iões de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e o detector o componente que produz um sinal proporcional à abundância relativa dos iões que o atingem.

Ao longo das últimas décadas, vários foram os métodos de ionização da amostra estudados que acompanharam o desenvolvimento desta técnica. A ionização por impacto electrónico e a ionização química foram os primeiros métodos de ionização da história da espectrometria de massa. Estes dois métodos de ionização requerem a volatilização da amostra previamente à sua ionização, condicionando assim a sua aplicação apenas a analitos voláteis ou termicamente estáveis. No método de ionização por impacto electrónico, a ionização é conseguida pela colisão de um feixe de electrões com as moléculas da amostra em fase gasosa. Já o método de ionização química, envolve a ionização prévia de um gás reagente que, através de reacções de transferência de carga ou de reacções ácido-base, é o responsável pela ionização da amostra.

A necessidade de analisar e caracterizar estruturalmente moléculas pouco voláteis e de elevado peso molecular ou moléculas termicamente instáveis, conduziu ao desenvolvimento de novos métodos de ionização. O aparecimento de um método de

ionização designado por bombardeamento com átomos rápidos (FAB) alargou significativamente a gama de compostos aplicáveis a análises por espectrometria de massa. Este método de ionização baseia-se no impacto de um feixe intenso de partículas (átomos ou iões) aceleradas com uma dada energia, numa amostra dissolvida numa matriz e depositada sobre uma superfície metálica. A formação da molécula protonada  $[M+H]^+$  depende da afinidade protónica da matriz e do analito, pelo que a matriz desempenha um papel importante no processo de ionização. No entanto, e apesar desta técnica permitir a análise de uma larga gama de compostos, é conhecido que todas as matrizes produzem ruído químico, o que pode mascarar os sinais provenientes da amostra a analisar.

Mais recentemente, nos anos 90, surgiram duas novas técnicas de ionização, MALDI e o electrospray (secção 3.3.2), que são hoje em dia as mais utilizadas e com principal aplicação na análise de compostos com elevado peso molecular.

Os iões formados na fonte são então introduzidos no analisador. Existem diversos analisadores: analisadores eléctrico e magnético, quadrupolos, trapa de iões, analisadores de ressonância magnética de transformada de Fourier e analisadores de tempo de voo. Uma vez os iões separados são conduzidos para o detector do espectrómetro de massa, sendo os mais usados a caixa de Faraday, multiplicador de electrões, detector de Daly, detector de array, detector de multi-canaís e detector de pós-aceleração.

Os estudos de caracterização por espectrometria de massa dos derivados sintetizados foram efectuados usando um espectrómetro Q-TOF 2 (Micromass Manchester), equipado com uma fonte de ionização por electrospray, cujo analisador é constituído por um duplo quadrupolo acoplado com um analisador de tempo de voo (TOF), com reflectão e um detector multiplicador de electrões. Não se encontra no âmbito deste trabalho efectuar uma descrição exaustiva de espectrómetros de massa. No entanto, far-se-á de seguida uma breve referência ao funcionamento de cada um dos componentes que constituem o espectrómetro de massa utilizado para a realização deste trabalho científico.

### **3.3.2- Ionização por Electrospray (ESI)**

O método de ionização por Electrospray (ESI) (Figura 3.7) não é, de facto considerado como um verdadeiro método de ionização. Os métodos de ionização no sentido lato da palavra, abrangem todos os que promovem a conversão directa de

moléculas neutras em iões. Em ESI ocorre a transição de iões da amostra em solução para a fase gasosa, mediante a formação de gotas electricamente carregadas. A evaporação do solvente ou a desintegração provocam uma diminuição do volume da gota e possibilitam a formação de iões em fase gasosa (Figura 3.7). Em ESI, a amostra em solução é introduzida num capilar e sujeita à aplicação de um campo eléctrico muito elevado. Quando a amostra atinge a ponta do capilar existe uma elevada acumulação de carga à superfície do líquido, devido à aplicação do referido potencial, o que promove a sua destabilização e a formação de um cone, designado por cone de Taylor. Este cone torna-se instável produzindo um filamento com uma superfície carregada. A uma certa distância do fim do capilar, este filamento torna-se instável produzindo pequenas gotículas com um excesso de cargas positivas. A evaporação do solvente provoca uma diminuição do volume da gota até que o excesso de carga é suficiente para anular a tensão superficial da gota (no limite de carga permitida designado por limite de Rayleigh) facilitando a sua cisão e a formação de iões em fase gasosa.

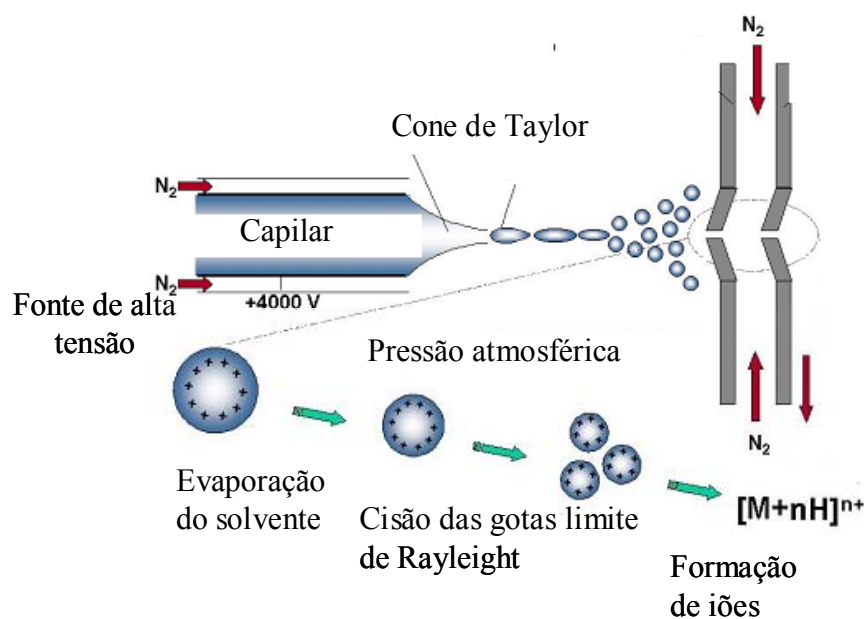


Figura 3.7- Representação esquemática do processo de electrospray.<sup>5</sup>

### 3.3.3- Quadrupolos

Um quadrupolo (Figura 3.8) é constituído por quatro barras cilíndricas condutoras às quais são aplicados valores de frequência contínua e de radiofrequência positivos e negativos, permitindo desta forma que seja gerado um campo quadrupolar. Efectuando uma variação dos valores de corrente aplicados, apenas os iões que devido a esta aplicação possuem uma trajectória estável atingem o detector. Os restantes iões serão eliminados durante a trajectória e não são detectados.

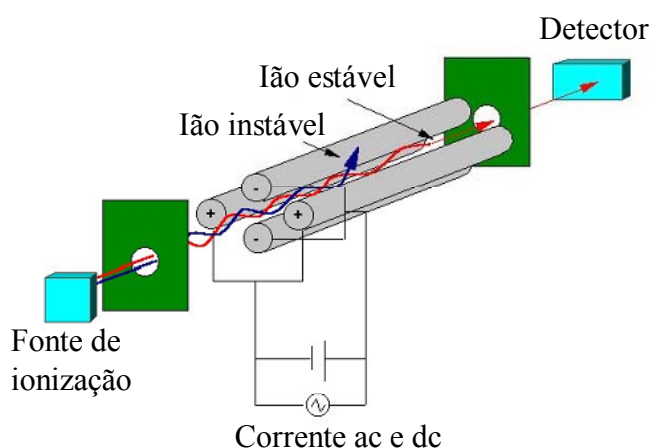


Figura 3.8- Representação esquemática de um analisador quadrupolo.

### 3.3.4- Analisadores de tempo de voo (TOF)

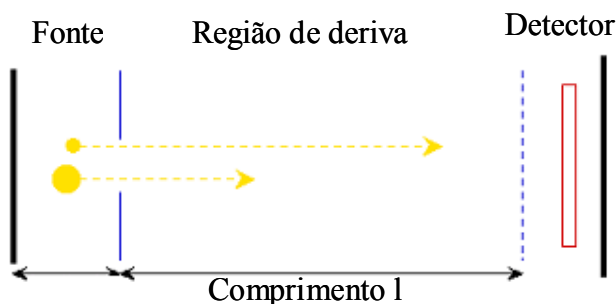


Figura 3.9- Representação esquemática de um analisador de tempo de voo (TOF).

Um analisador TOF (Figura 3.9) é constituído por um tubo com um dado comprimento  $l$ . A separação dos iões segundo a razão massa/carga apresentada tem como princípio o tempo de voo dos iões ao longo da região de deriva; os iões produzidos na fonte de ionização e acelerados em direcção à região de deriva, atingem-na idealmente com a mesma energia cinética, os iões com massa superior terão um tempo de voo superior atingindo o detector depois dos iões de menor massa.

A maioria destes analisadores possui ainda reflectrão. O reflectrão é um sistema de lentes ou anéis de voltagens crecentes colocado no fim do tubo do TOF. Os iões produzidos penetram no reflectrão até atingirem uma energia cinética nula sendo depois reacelerados no sentido de trajectória inverso. Desta forma, iões de massa superiores penetram mais no reflectrão aumentando assim a trajectória e consequentemente o tempo que demoram a atingir o detector. Desta forma, o uso de reflectrão permite obter uma maior resolução.

Este tipo de analisadores além de pouco dispendiosos, apresentam uma elevada sensibilidade e não apresentam limite de massas aplicáveis.

### 3.3.5- Espectrometria de massa Tandem (MS/MS)

A espectrometria de massa Tandem também designada por MS/MS permite avaliar as fragmentações dos iões produzidos na fonte de ionização possibilitando assim a obtenção de mais informação estrutural acerca de um dado ião. Esta técnica tem sido usada na caracterização estrutural de *meso*-tetra-arilporfirinas<sup>6-13</sup> e também na caracterização estrutural de produtos de degradação das porfirinas resultantes do metabolismo celular.<sup>14</sup>

Este tipo de aplicação exige, geralmente, o acoplamento de vários analisadores. No primeiro analisador é seleccionado o ião precursor. A fragmentação deste ião é induzida por colisão com um gás na câmara de colisão situada entre o primeiro e o segundo analisador e, os iões produto e fragmentos neutros são então analisados no segundo analisador.

Desta forma é possível fazer a análise dos iões produto (também chamados de iões fragmento), da perda de moléculas neutras e de iões precursores que deram origem a um dado produto com uma dada massa: para obter informação acerca dos iões que resultam da

fragmentação de um dado íão precursor, faz-se a selecção desse íão no primeiro analisador e, após fragmentação, faz-se um varrimento dos íões produto.

### 3.4- Caracterização por ESI-MS/MS dos derivados 17-23

As porfirinas estudadas no âmbito deste trabalho e que deram origem a este capítulo são, conforme indicado anteriormente, porfirinas *meso* substituídas que apenas diferem no resíduo aminoácido acoplado a um dos fenilos. As outras posições *meso* são ocupadas por grupos *m*-metoxifenilo. Desta forma, será de esperar que os espectros de MS/MS dos derivados **17-23** apresentem, além de íões fragmento típicos da cadeia lateral R<sup>1</sup> de cada um dos aminoácidos acoplados, algumas vias de fragmentação comuns. Neste capítulo será feita a análise dos espectros de ESI-MS/MS destes derivados, fazendo referência a todos estes aspectos.

De forma a simplificar a análise dos espectros de massa dos derivados porfirina-aminoácido sintetizados, procedeu-se também ao estudo por ESI-MS/MS do derivado 5,10,15,20-tetraquis(3-metoxifenil)porfirina **26** (Figura 3.11). A análise do espectro de MS/MS desta porfirina substituída nas quatro posições *meso* por grupos *m*-metoxifenilo é importante pois fornece informação valiosa acerca das fragmentações típicas do grupo *m*-metoxifenilo, permitindo assim diferenciar as fragmentações deste grupo substituinte das fragmentações devidas ao aminoácido.

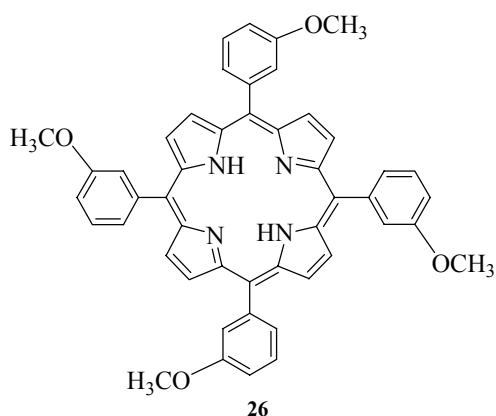


Figura 3.11- 5,10,15,20-tetraquis(3-metoxifenil)porfirina.

De seguida, e para uma clara exposição dos resultados, faz-se em primeiro lugar a análise dos espectros de ESI-MS/MS da porfirina **26**, seguindo-se os conjugados de tipo

porfirina-aminoácido (**17-21**) e, por último, os derivados de tipo diporfirina-aminoácido (**22** e **23**).

### 3.4.1- Resultados de ESI-MS e discussão

Os espectros de ESI-MS destes compostos são caracterizados pela presença, no caso dos conjugados de tipo porfirina-aminoácido (**17-21**) e da porfirina **26**, da molécula protonada  $[M+H]^+$ . Relativamente aos espectros de ESI-MS dos conjugados de tipo diporfirina-aminoácido (**22** e **23**), além do ião de carga unitária  $[M+H]^+$ , salienta-se também a presença de um ião de carga dupla  $[M+2H]^{2+}$ . As fragmentações destes iões foram induzidas por colisão com argon e foram posteriormente estudadas.

#### 3.4.1.1- Fragmentação da porfirina **26**

O espectro de MS/MS do ião  $[M+H]^+$  da porfirina **26** ( $[M+H]^+$  a  $m/z$  735) apresenta fragmentos devidos à presença dos grupos *m*-metoxifenilo (Tabela 3.1).

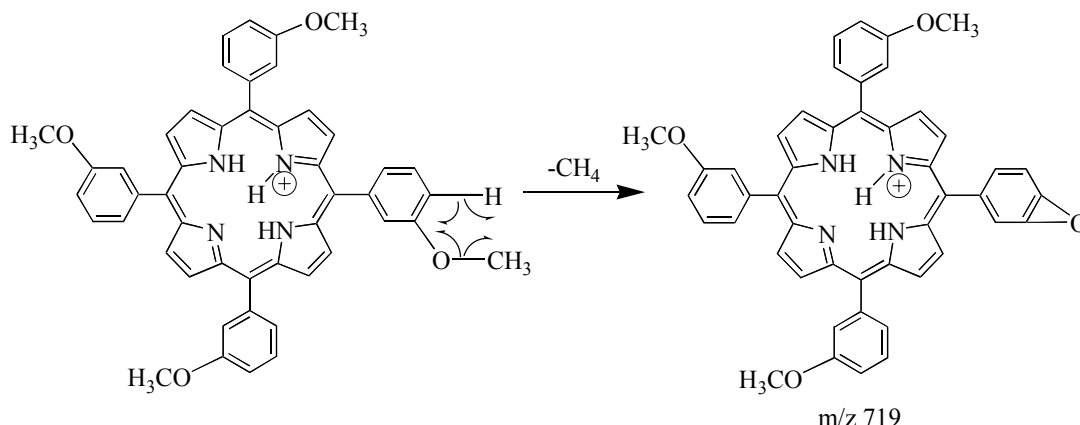
Tabela 3.1- Resumo do espectro de MS/MS do ião  $[M+H]^+$  da porfirina **26**, com indicação dos valores de  $m/z$  e abundância relativa de cada ião fragmento.

$m/z$	720	719	705	704	703	692	691	666	613	585
<b>Perda</b>	$CH_3^\bullet$	$CH_4$	$CH_2O$	$CH_3O$	$HOCH_3$	$CH_3CO$	$HCOCH_3$	$CH_3CO$ e $C_2H_2$	$CH_3^\bullet e$ $^\bullet C_6H_4OCH_3$	$CH_3CO$ e $^\bullet C_6H_4OCH_3$
<b>AR*</b>	11%	100%	6%	8%	39%	25%	92%	34%	60%	41%

\*-abundância relativa

Como é possível verificar pela análise da Tabela 3.1, o ião mais abundante corresponde à perda de  $CH_4$ . No Esquema 3.5 é apresentado um possível mecanismo para a formação deste ião fragmento.





Esquema 3.5- Mecanismo proposto para a formação do ião  $m/z$  719.

Os iões observados neste espectro de MS/MS e correspondentes às perdas de  $\text{CH}_3^\bullet$  (-15 Da),  $\text{CH}_2\text{O}$  (-30 Da),  $\text{CH}_3\text{CO}$  (-31 Da), e a perdas combinadas de  $\text{CH}_3\text{CO}$  e de  $\text{C}_2\text{H}_2$  (-69 Da) são fragmentações típicas de metoxibenzeno e encontram-se já extensamente descritas na literatura.<sup>15,16</sup>

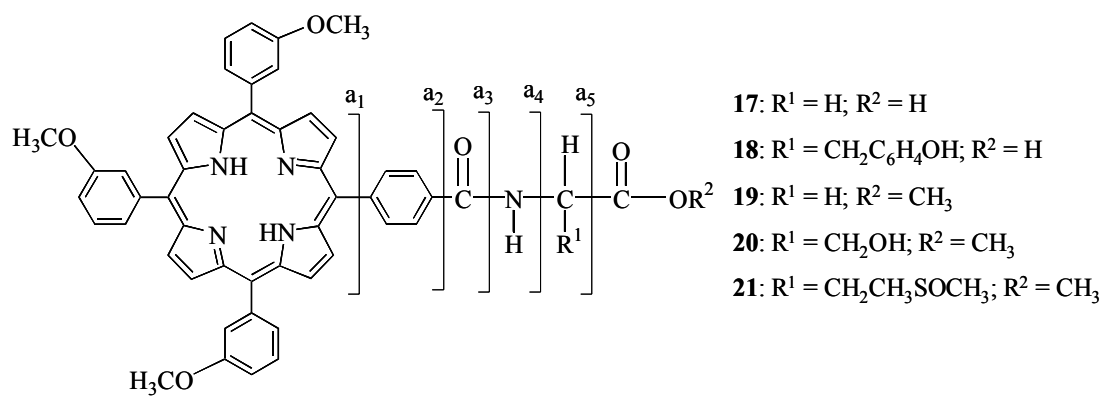
Durante a caracterização estrutural dos derivados de tipo porfirina-aminoácido sintetizados, as fragmentações devido aos grupos metoxifenilo previamente mencionadas, apenas serão referidas quando necessário, dado que não fornecem informação acerca da ligação porfirina-aminoácido.

#### 3.4.1.2-Estudo das fragmentações dos conjugados de tipo porfirina-aminoácido **17-21**

A análise dos espectros de ESI-MS/MS dos derivados de tipo monoporfirinilo **17-21** (Figuras 3.12 e 3.13) permite identificar facilmente a presença de vários iões fragmento comuns e dividi-los em dois grupos principais: os já referidos anteriormente e que surgem devido à presença dos grupos *m*-metoxifenilo no núcleo porfirínico, e os que resultam de fragmentações ao longo do substituinte na posição 5.

Relativamente aos primeiros, embora comuns a todos os espectros, verificámos que este tipo de fragmentação é mais frequente no caso dos derivados acoplados a aminoácidos estruturalmente mais simples como a glicina, glicinato de metilo e serinato de metilo (derivados **17**, **18** e **19**, respectivamente).

No que respeita às fragmentações ao longo do substituinte na posição 5, é possível prever vários locais de fragmentação, designados por  $a_1$ - $a_5$  (Esquema 3.6).



Esquema 3.6 – Possíveis locais de fragmentação envolvendo o substituinte na posição 5.

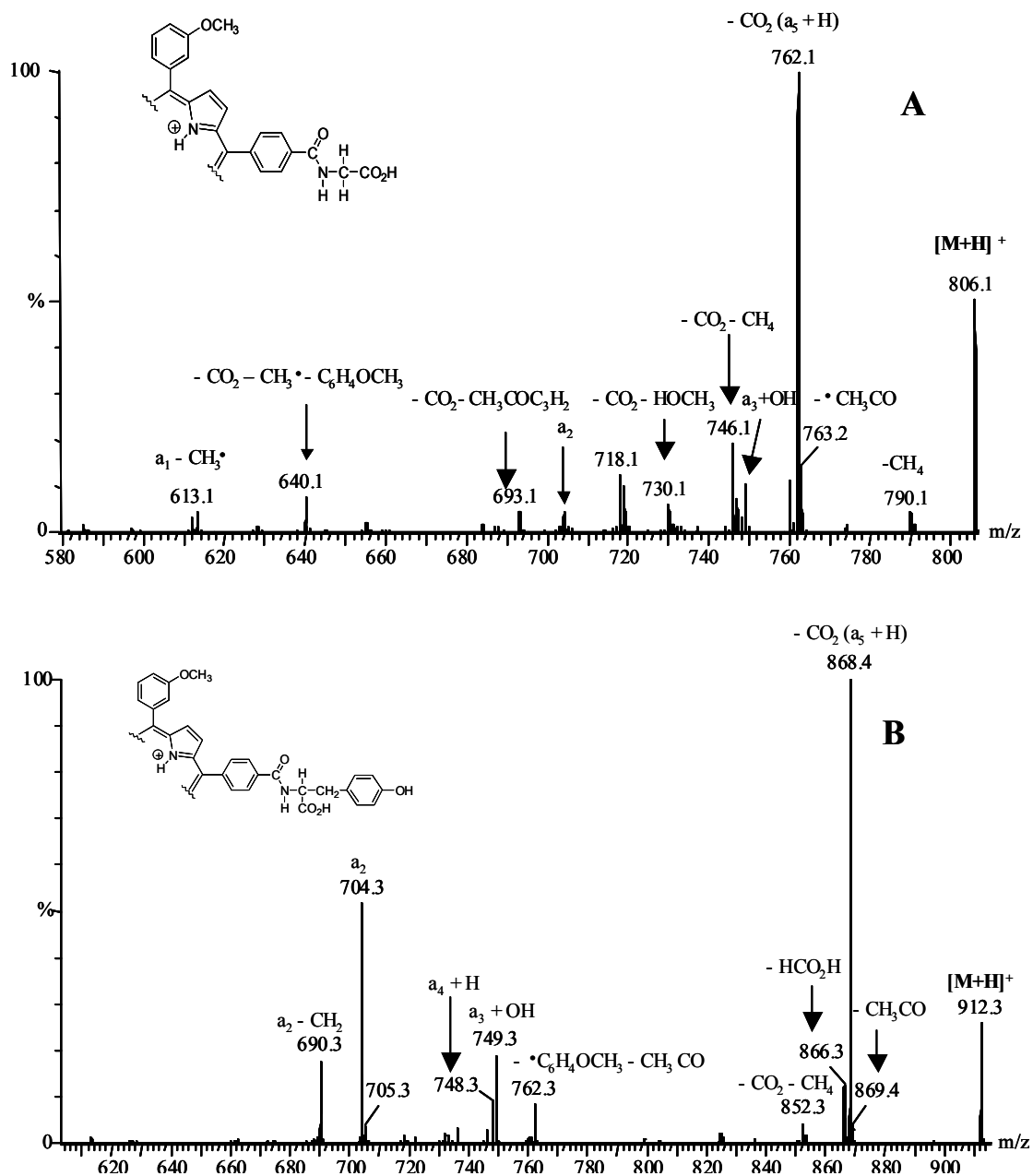


Figura 3.12 - Espectros de ESI-MS/MS dos íons  $[\text{M} + \text{H}]^+$  dos derivados 17 (A) e 18 (B).

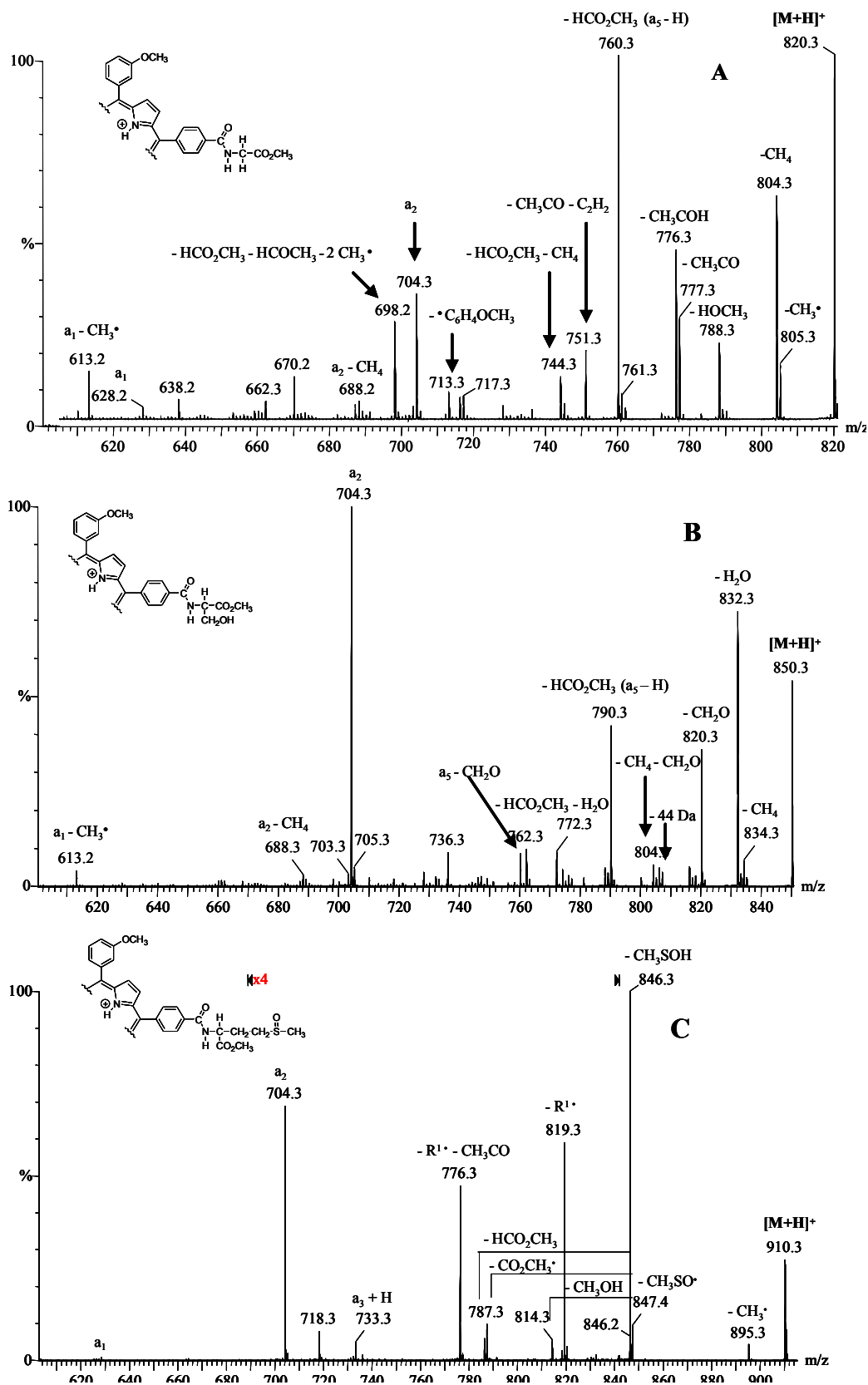


Figura 3.13-Espectros de ESI-MS/MS dos íons  $[M+H]^+$  dos derivados 19 (A), 20 (B) e 21 (C).

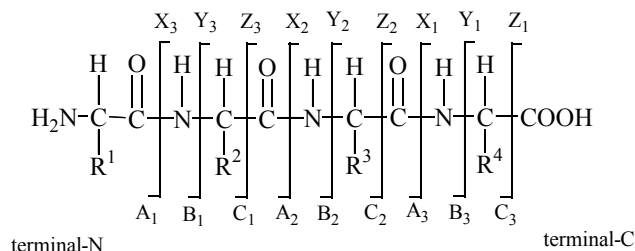
Os iões fragmento de tipo  $a_1$  ( $m/z$  628) e  $a_2$  ( $m/z$  704) ocorrem com abundâncias relativas diferentes para cada um dos derivados. O primeiro,  $a_1$ , de abundância relativa inferior a 7% em todos os casos, resulta da clivagem homolítica da ligação carbono-carbono entre o núcleo porfirínico e o anel fenilo substituído com o aminoácido. O fragmento  $a_2$ , de abundância relativa bastante superior, é o pico base do espectro de MS/MS do derivado **20**. Este fragmento é formado também por clivagem homolítica, mas desta vez da ligação carbono-carbono entre o fenilo e o carbono carbonílico da ligação amida. Este tipo de fragmentação, que conduz à perda do grupo substituinte ligado à posição *para* do grupo fenilo, foi já observada anteriormente nos espectros de FAB<sup>+</sup> destes derivados (secção 3.2) e em outros estudos de FAB-MS/MS de *meso*-tetra-arilporfirinas substituídas com sulfonamidas,<sup>8</sup> ácidos gordos<sup>9</sup> e grupos nitro<sup>10</sup>, e de ESI-MS/MS no caso de *meso*-tetra-arilporfirinas substituídas por grupos nitro<sup>11</sup> e açúcares.<sup>12</sup>

Os espectros de MS/MS dos derivados **17**, **18**, **19** e **20** apresentam outros iões fragmento comuns de tipo  $a_3$  ( $m/z$  732) e  $a_4$  ( $m/z$  747), com abundâncias relativas inferiores a 5%, que são formados respectivamente, por clivagem homolítica da ligação amida e da ligação nitrogénio-carbono adjacente. No entanto, estas vias de fragmentação não são observadas no espectro de MS/MS do derivado **21**.

Curiosamente, a fragmentação designada por  $a_3$  é uma fragmentação que ocorre com abundância relativa muito baixa, ao contrário do que seria de esperar tendo em conta a fragmentação típica de compostos contendo ligações amida,<sup>17</sup> peptídeos<sup>18,19</sup> e mesmo em derivados de *meso*-tetra-arilporfirinas que apresentam, de forma análoga aos derivados sintetizados, grupos substituintes acoplados via uma ligação amida à posição *para* de um grupo fenilo.<sup>14</sup> Nas amidas e *meso*-tetra-arilporfirinas, esta clivagem, embora não corresponda ao pico base dos espectros, ocorre com abundância relativa significativa. No caso particular das amidas, esta fragmentação conduz ao fragmento que retém a carga no grupo carbonilo, o que não acontece no caso dos derivados **17-21**. Estudos de “deuteração” efectuados com estes compostos permitem concluir que, nos derivados em estudo, a localização da carga ocorre preferencialmente no núcleo porfirínico. Desta forma, podemos concluir que a localização preferencial da carga longe da ligação amida poderá contribuir para a baixa abundância relativa ou mesmo ausência deste tipo de fragmentação.

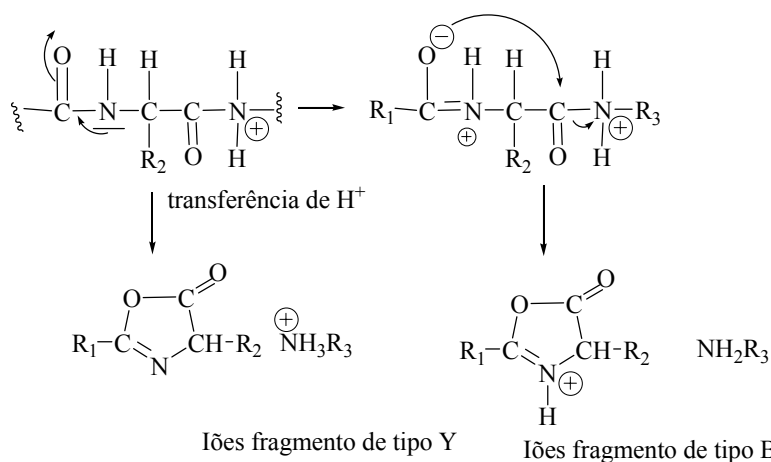
Relativamente aos peptídeos, Roepstorff propôs uma nomenclatura para identificar os fragmentos de peptídeos lineares.<sup>18</sup> Estes fragmentos correspondem a clivagens que

ocorrem ao longo da cadeia peptídica e que conduzem à formação de iões de tipo A, B e C, quando a carga é retida no fragmento terminal-N, ou X, Y e Z, quando a carga é retida no fragmento terminal-C (Esquema 3.7).



Esquema 3.7- Nomenclatura proposta por Roepstorf para a fragmentação de peptídeos lineares.<sup>18</sup>

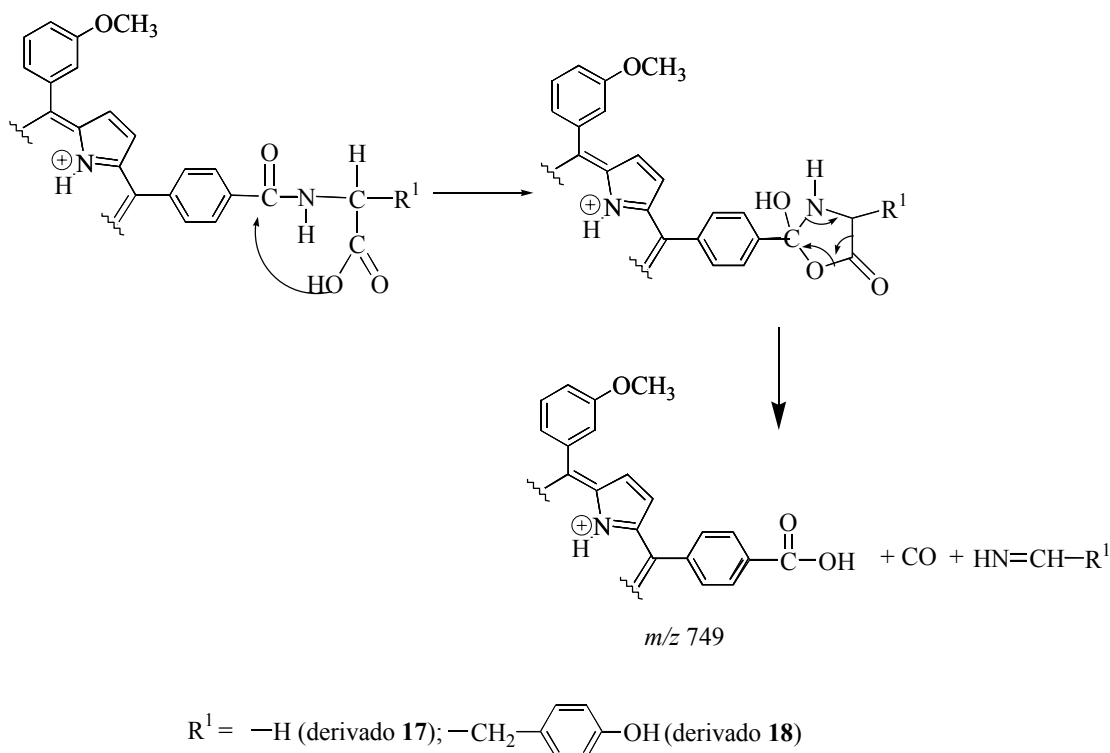
Nos peptídeos, a ligação amida é referida como uma das ligações mais fracas, conduzindo normalmente a iões abundantes nos espectros de MS/MS, com formação de iões designados por Y e B. O facto de, nos derivados porfirínicos estudados, a quebra desta ligação ocorrer com abundância relativa muito baixa ou mesmo inexistente, pode ser entendida considerando os mecanismos propostos recentemente para a formação desta via de fragmentação (Esquema 3.8).<sup>20</sup>



Esquema 3.8- Mecanismo proposto para a clivagem da ligação peptídica com formação de iões fragmento de tipo Y e B.<sup>20</sup>

Este mecanismo envolve a formação de um composto de cinco lados (oxazolona, protonada no caso de íões fragmento de tipo B) formado pelo ataque nucleofílico de um oxigénio carbonílico ao carbono carbonílico da ligação amida adjacente. Portanto, este tipo de fragmentação implica a participação de duas ligações amida, não sendo por isso aplicável no caso dos derivados **17-21**.

Passando agora à análise dos espectros de MS/MS de cada um dos derivados relativamente a outras vias de fragmentação, verifica-se que estas são significativamente diferentes no caso dos derivados **17** e **18** que apresentam um grupo ácido terminal ( $R^2 = H$ ). Nestes casos, o ião fragmento mais abundante obtido a partir do ião molecular  $[M+H]^+$ , corresponde à perda de  $CO_2$  (-44 Da). Este ião pode ser justificado por uma descarboxilação do resíduo aminoácido com migração de um átomo de hidrogénio para o fragmento que retém a carga ( $a_5+H$ ). Nestes espectros é também observado uma fragmentação, de menor abundância relativa, a  $m/z$  760 para o derivado **17** e a  $m/z$  866 para o derivado **18**, que podem ser justificados por perda de  $HCO_2H$  (-46 Da), fragmentação de tipo  $a_5-H$ . Outra fragmentação também característica destes derivados **17** e **18** com um grupo ácido terminal, corresponde ao aparecimento de um ião a  $m/z$  749 (Esquema 3.9)



Esquema 3.9- Via de fragmentação proposta para a perda combinada de CO e da imina  $HN=CHR^1$  observada nos espectros de MS/MS dos derivados **17** e **18**.

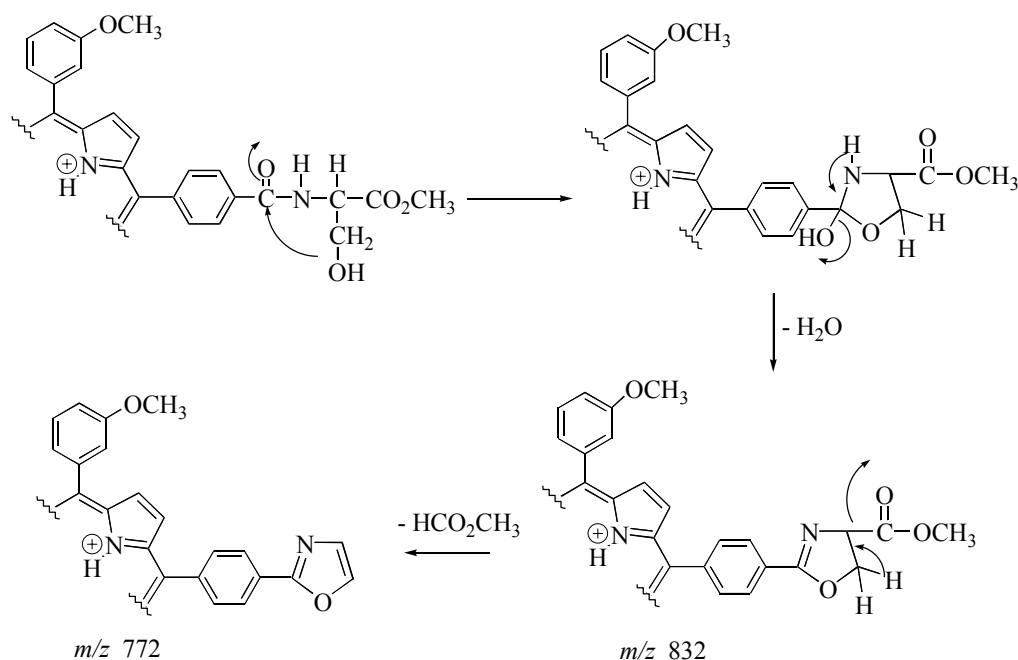
Curiosamente, este íon fragmento observado a  $m/z$  749, apresenta abundância relativa superior ao íon observado a  $m/z$  748 ( $a_4 + H$ ) e pode ser formado por perda combinada de CO e da imina  $NH=CHR^1$ , com migração do grupo OH terminal, de acordo com o mecanismo sugerido no Esquema 3.9. Este mecanismo está de acordo com o proposto para peptídeos na presença de sódio,<sup>21</sup> e para peptídeos protonados.<sup>22</sup> Os resultados obtidos sugerem que este mecanismo ocorre quer na ausência de um cátion metálico que segundo Schossler *et al*<sup>20</sup> e Tang *et al*<sup>21</sup> favorece o ataque nucleofílico inicial, quer quando a localização da carga ocorre preferencialmente no macrociclo porfirínico e não no oxigénio do grupo carbonilo do aminoácido tal como verificado por Tomer *et al* para o caso de peptídeos protonados.<sup>22</sup>

Estes íões fragmento não são observados nos espectros de MS/MS dos compostos **19**, **20** e **21** em que o resíduo de aminoácido está na forma de éster metílico ( $R^2 = CH_3$ ). Os derivados **19** e **20** fragmentam com perdas de  $HCO_2CH_3$  ( $a_5-H$ , -60 Da), dando origem a íões a  $m/z$  760 e 790, respectivamente. Curiosamente, o composto **21**, apenas apresenta a perda de  $HCO_2CH_3$  após perda de  $CH_3SOH$  ( $m/z$  786).



No que respeita à fragmentações devidas à cadeia lateral  $R^1$ , não é retirado qualquer tipo de informação adicional no caso dos espectros de MS/MS dos derivados **17** e **19** ( $R^1=H$ ). Porém, nos espectros de MS/MS dos derivados **18**, **20** e **21** as fragmentações da cadeia lateral conduzem à formação dos iões mais abundantes.

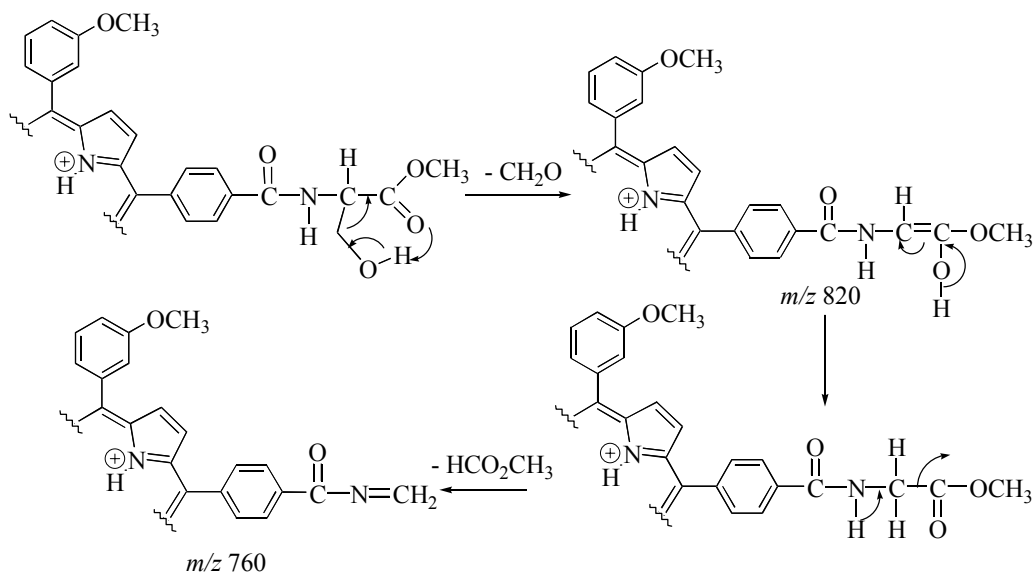
Assim, nos espectros de MS/MS do derivado **20** ( $R^1 = CH_2OH$ ), destacam-se os iões a  $m/z$  832,  $m/z$  820 e  $m/z$  772. O primeiro ião é formado por perda de  $H_2O$  a partir de  $[M+H]^+$ , que corresponde a um fragmento abundante em cadeias peptídicas com aminoácido serina.<sup>15</sup> O ião observado a  $m/z$  772 pode ser justificado pela perda combinada de  $H_2O$  e de  $HCO_2CH_3$ ; uma possível via de fragmentação através de um intermediário de tipo oxazolina ( $m/z$  832) é apresentado no Esquema 3.10.



Esquema 3.10– Via de fragmentação proposta para a perda combinada de  $H_2O$  e  $HCO_2CH_3$  a partir da molécula protonada  $[M+H]^+$  do derivado **20**.

Outra característica importante observada no espectro de MS/MS do derivado **20** é a formação do ião a  $m/z$  820 com abundância relativa elevada (40% AR) e que corresponde à perda de  $CH_2O$ . Provavelmente, a presença de uma ligação intramolecular por uma ponte de hidrogénio entre o grupo carbonilo e o grupo hidroxilo poderá facilitar a eliminação de formaldeído através de um rearranjo de McLafferty (Esquema 3.11). Esta fragmentação

poderá também ter lugar associada à perda de  $\text{HCO}_2\text{CH}_3$  culminando na formação do ião a  $m/z$  760 (Esquema 3.11).



Esquema 3.11– Via de fragmentação proposta para a perda de  $\text{CH}_2\text{O}$  e de  $\text{HCO}_2\text{CH}_3$  a partir da molécula protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  do composto **20**.

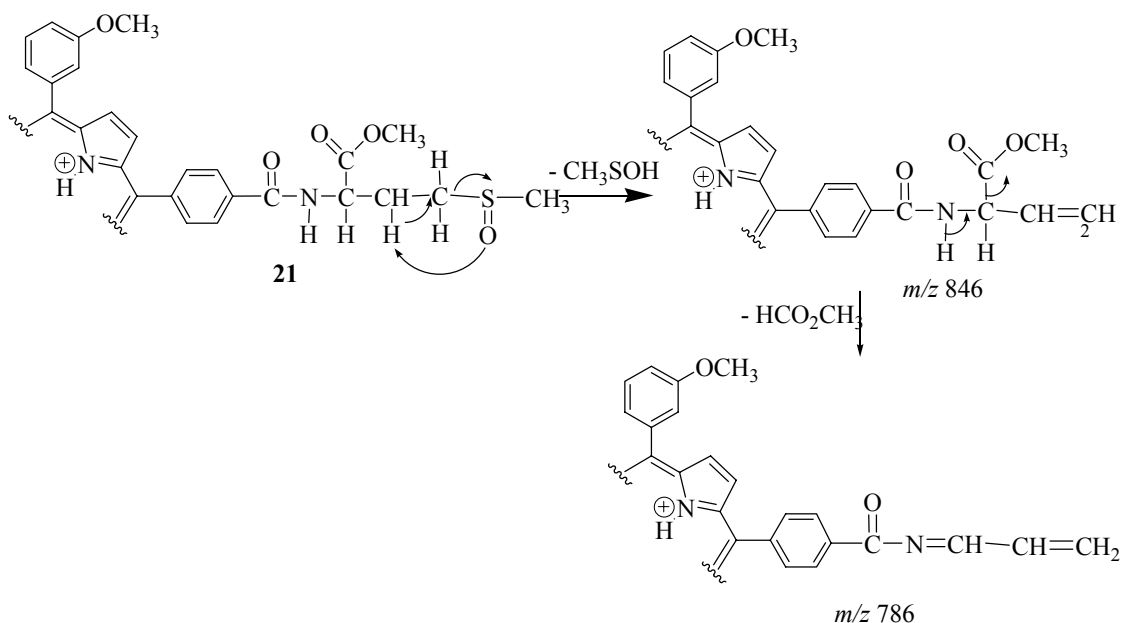
Ainda há a referir que a perda de  $\text{CH}_2\text{O}$  associada à perda de  $\text{CH}_4$  (perda característica do grupo metoxilo do núcleo porfirínico) e associada à fragmentação de tipo  $a_5$ , dá origem aos iões a  $m/z$  804 e  $m/z$  760, respectivamente.

O espectro de MS/MS do derivado **18** ( $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) apresenta fragmentos devido à perda de  $\text{CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$  (-106 Da) associada com a já referida perda de  $\text{CO}_2$  (-44 Da) a  $m/z$  762 e a  $m/z$  748 correspondendo ao fragmento  $a_4+\text{H}$  (Figura 3.13B).

Relativamente ao derivado **21**, que resultou do acoplamento da porfirina **4** a metioninato de metilo, o espectro de ESI-MS também apresenta o ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  910, superior em 16 unidades de massa ao esperado, tal como observado no espectro de  $\text{FAB}^+$  (secção 3.2). A oxidação do resíduo metioninato de metilo é confirmado pela análise do espectro de MS/MS do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; o pico base deste espectro corresponde à perda de 64 Da, característica do aminoácido metionina na sua forma oxidada.<sup>23</sup> Este ião deve-se a uma fragmentação parcial de  $\text{R}^1$ , e corresponde à perda da molécula neutra de  $\text{CH}_3\text{SOH}$  (Esquema 3.12). Outra fragmentação que confirma a oxidação é a perda de  $\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_3$  (-  $\text{R}^{1\bullet}$ ) dando origem ao ião a  $m/z$  819; esta fragmentação em conjunto

com a perda de  $\text{CH}_3\text{CO}$  (característica da fragmentação dos grupos metoxilo) origina o ião observado a  $m/z$  776.

Como já referido, a perda de  $\text{HCO}_2\text{CH}_3$  e de  $^{\bullet}\text{CO}_2\text{CH}_3$  ocorre apenas quando combinada com a perda de  $\text{CH}_3\text{SOH}$  conduzindo à formação de iões a  $m/z$  846 e  $m/z$  786 (Esquema 3.12).



Esquema 3.12 - Via de fragmentação proposta para a formação de iões a  $m/z$  846 (perda de  $\text{CH}_3\text{SOH}$ ) e  $m/z$  786 (perda de  $\text{HCO}_2\text{CH}_3$ ) observados no espectro de MS/MS do composto **21**.

Deve-se ainda salientar que, de forma a confirmar a composição de cada um dos fragmentos dos derivados **17-21**, foram efectuados estudos de composição elementar (Tabela 3.2). O erro encontrado entre as massas observadas e as massas calculadas varia entre  $-0,1$  e  $12,9$  mDa, permitindo concluir que os iões fragmento foram identificados com elevado grau de confiança.

3.4.1.2.3- Estudo das fragmentações dos derivados de tipo diporfirinilo **22** e **23**.

Tal como mencionado anteriormente, os espectros de ESI-MS dos derivados **22** e **23** apresentam iões de carga unitária  $[M+H]^+$ , e iões de carga dupla  $[M+2H]^{2+}$ , que resultam da protonação de um ou dos dois núcleos porfirínicos presentes na molécula.

Os picos mais abundantes do envelope molecular dos iões  $[M+H]^+$  estão de acordo com os padrões isotópicos determinados (Figura 3.14).

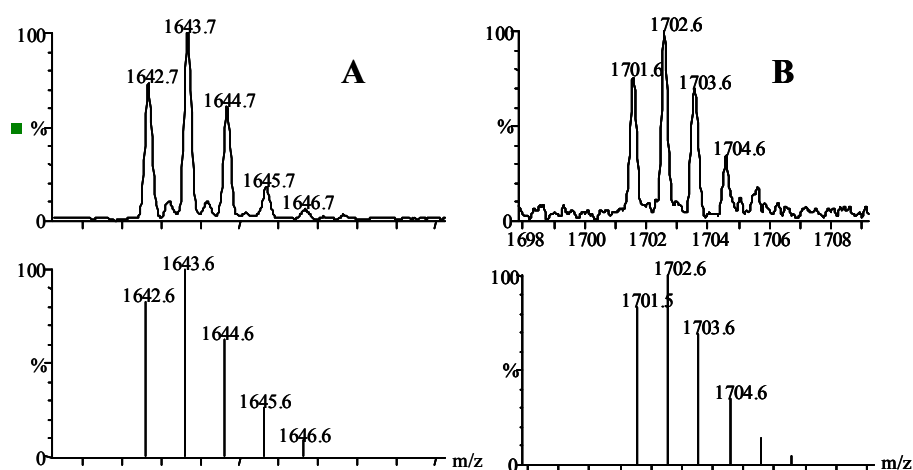


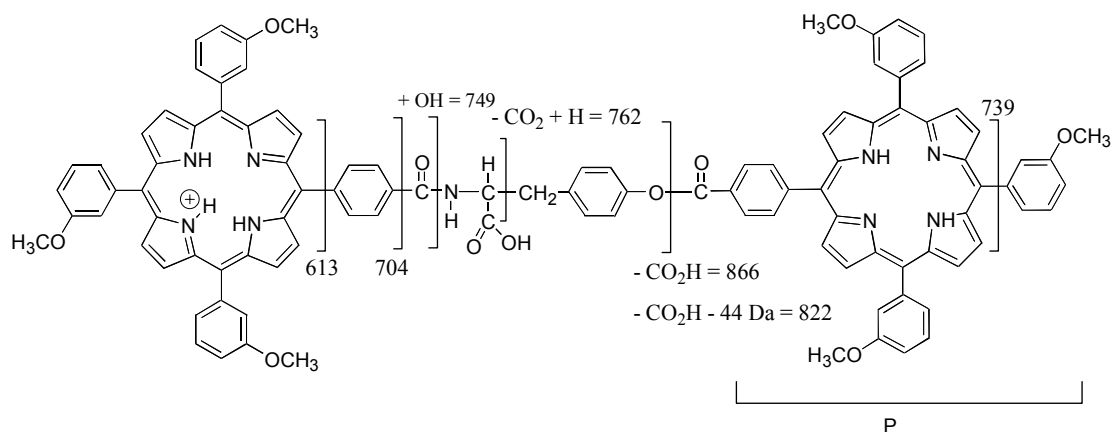
Figura 3.14 – Padrão isotópico observado e calculado dos iões  $[M+H]^+$  dos derivados **22** (A) e **23** (B).

Da análise dos espectros de MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  e  $[M+2H]^{2+}$ , é possível verificar a semelhança entre as vias de fragmentação observadas e as descritas anteriormente para os derivados de tipo monoporfirinilo **17-21** (Figuras 3.15 e 3.16).

O ião mais abundante do espectro de  $[M+H]^+$  do derivado **22** (Figura 3.15A) é o ião devido à perda de  $CO_2$ , tal como foi observado nos espectros de MS/MS dos derivados com um grupo ácido terminal. O segundo ião mais abundante, a  $m/z$  704, também já foi referido para os derivados **17-21** e é formado por clivagem homolítica entre a porfirina e o grupo carbonilo do aminoácido (Esquema 3.13).

A análise deste espectro permite ainda verificar a ocorrência de clivagens ao longo da cadeia de aminoácido que liga as duas unidades porfirínicas: o ião a  $m/z$  749 formado após migração do grupo hidroxilo do terminal ácido do aminoácido para o grupo carbonilo do resíduo porfirina com eliminação de CO e da imina característica, de acordo com o mecanismo já proposto para os derivados **17** e **18**. O ião a  $m/z$  866 é formado devido à

clivagem da ligação éster combinada com perda de 44 Da ( $\text{CO}_2$  e/ou  $\text{HCOCH}_3$ ). Este fragmento pode ainda perder 44 Da conduzindo à formação do ião a  $m/z$  822. O ião a  $m/z$  762 é originado pela perda combinada de  $\text{CO}_2$  e de  $\text{PCO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$  de acordo com o representado no Esquema 3.13.



Esquema 3.13- Fragmentações mais abundantes observadas no espectro de MS/MS do derivado **22**.

Também neste caso, a esperada clivagem da ligação amida que conduziria à formação de um ião fragmento a  $m/z$  732 (ou 733) não é observada, ao contrário de estudos de FAB-MS realizados em dímeros de unidades porfirínicas ligadas por uma ligação amida ou por uma função éster.<sup>25</sup>

O espectro de MS/MS do ião  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  do derivado **22** (Figura 3.15 B) apresenta quer iões de carga unitária quer iões de carga dupla.

Os primeiros resultam de clivagens ao longo do esqueleto de aminoácido estando sempre associados à perda de uma das moléculas de porfirina. Vários iões de carga unitária, como por exemplo os observados a  $m/z$  613, 704, 749 (750), 762 (763), e 866 também são observados nos espectros de MS/MS do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Nos espectros de MS/MS dos derivados **22** e **23** alguns fragmentos são observados com mais uma unidade de  $m/z$  quando comparados com os iões observados para as espécies monoméricas. Este efeito é devido à contribuição isotópica de cada um dos elementos que caracterizam a estrutura molecular de cada um dos derivados em estudo. Desta forma, verificamos que o ião mais abundante do envelope molecular do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  corresponde a  $\text{M}+2$ .

Quanto aos íões de carga dupla, estes são formados por clivagens dos grupos metoxifenilo e/ou da cadeia lateral carboxílica para que ocorra a manutenção das duas cargas. Estes íões foram identificados a  $m/z$  800 (perda de  $\text{CO}_2$ , - 44Da), 792 (perda combinada de  $\text{CH}_4$  e de  $\text{CO}_2$ ), 784 (perda combinada de  $\text{HOCH}_3$  e de  $\text{CO}_2$ ), 778 (perda combinada de  $\text{COCH}_3$  e de  $\text{CO}_2$ ), 771 (perda combinada de  $\text{COCH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  e de  $\text{CH}_3$ ), 739 (perda combinada de  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ ,  $\text{COCH}_3$  e  $\text{CH}_3$ ), 725 (perda combinada de  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$  e de  $2\text{COCH}_3$ ).

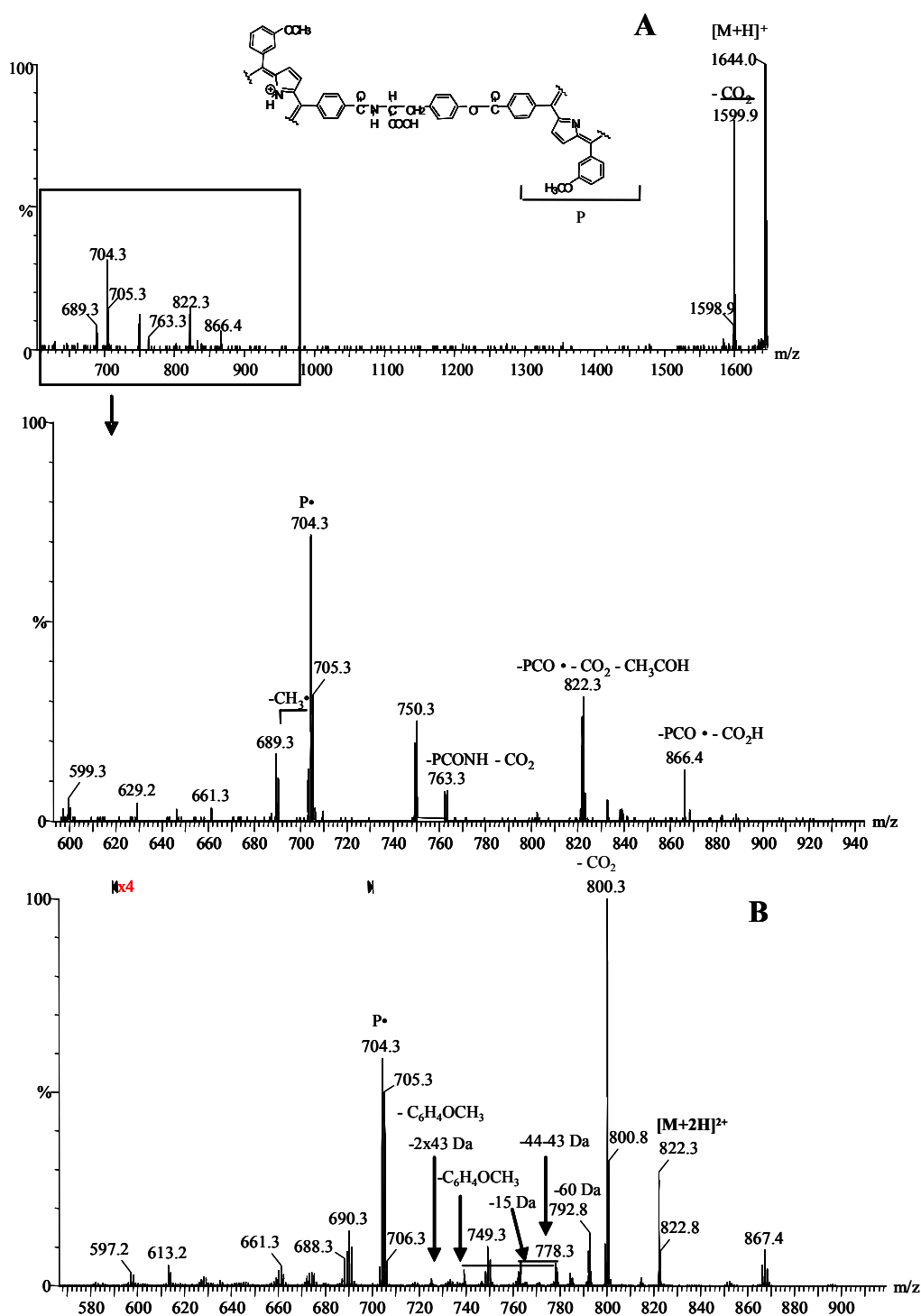
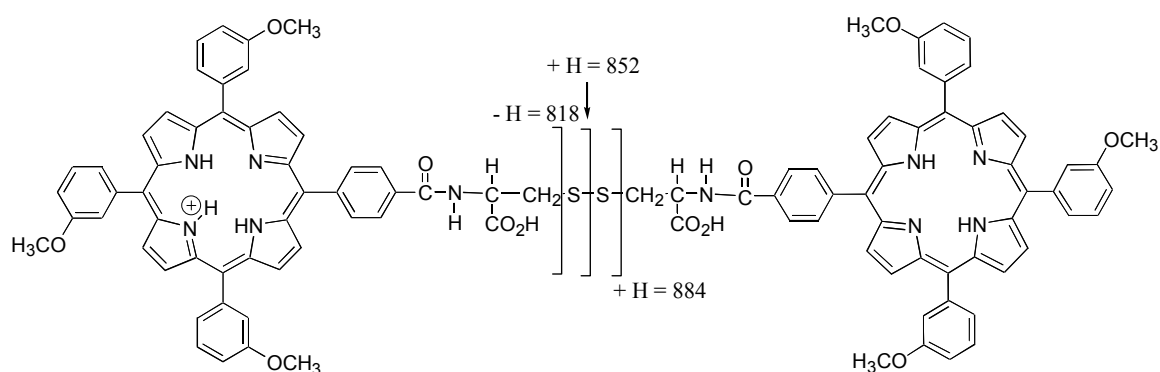


Figura 3.15 – Espectro de ESI-MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  (A) e  $[M+2H]^{2+}$  (B) do derivado 22.

Relativamente ao derivado 23, o espectro de ESI-MS/MS do ião  $[M+H]^+$  (Figura 3.16A) apresenta como ião mais abundante o ião a  $m/z$  884 (Esquema 3.14).<sup>25</sup> Este ião foi

formado pela clivagem da ligação S-C com migração de um átomo de H; este tipo de fragmentação já foi observada em moléculas contendo pontes dissulfureto.<sup>32</sup> Neste espectro também é possível observar a formação de um ião, de abundância relativa inferior ao anterior, a  $m/z$  852, que é devido à clivagem da ligação S-S. É conhecido que, em moléculas pequenas contendo pontes dissulfureto, a abundância relativa de cada um dos fragmentos que resultam da clivagem das ligações S-S e S-C é dependente da estrutura da molécula.<sup>25</sup>

O ião a  $m/z$  884 pode conduzir ainda a perda de uma molécula neutra de HSSH conduzindo à formação do ião a  $m/z$  818. Esta fragmentação é comparável com a perda típica de HOOH observada na fragmentação de hidroperóxidos (R-OOH).<sup>33</sup> Estas fragmentações também podem ocorrer combinadas com perdas de 44 e/ou 43 Da conduzindo à formação de iões a  $m/z$  774 (- 44 Da) e 731 (- 44 - 43 Da). Perda de 44 Da é também observada a partir de  $[M+H]^+$ .



Esquema 3.14 – Fragmentações mais abundantes observadas no espectro de MS/MS do derivado **23**.



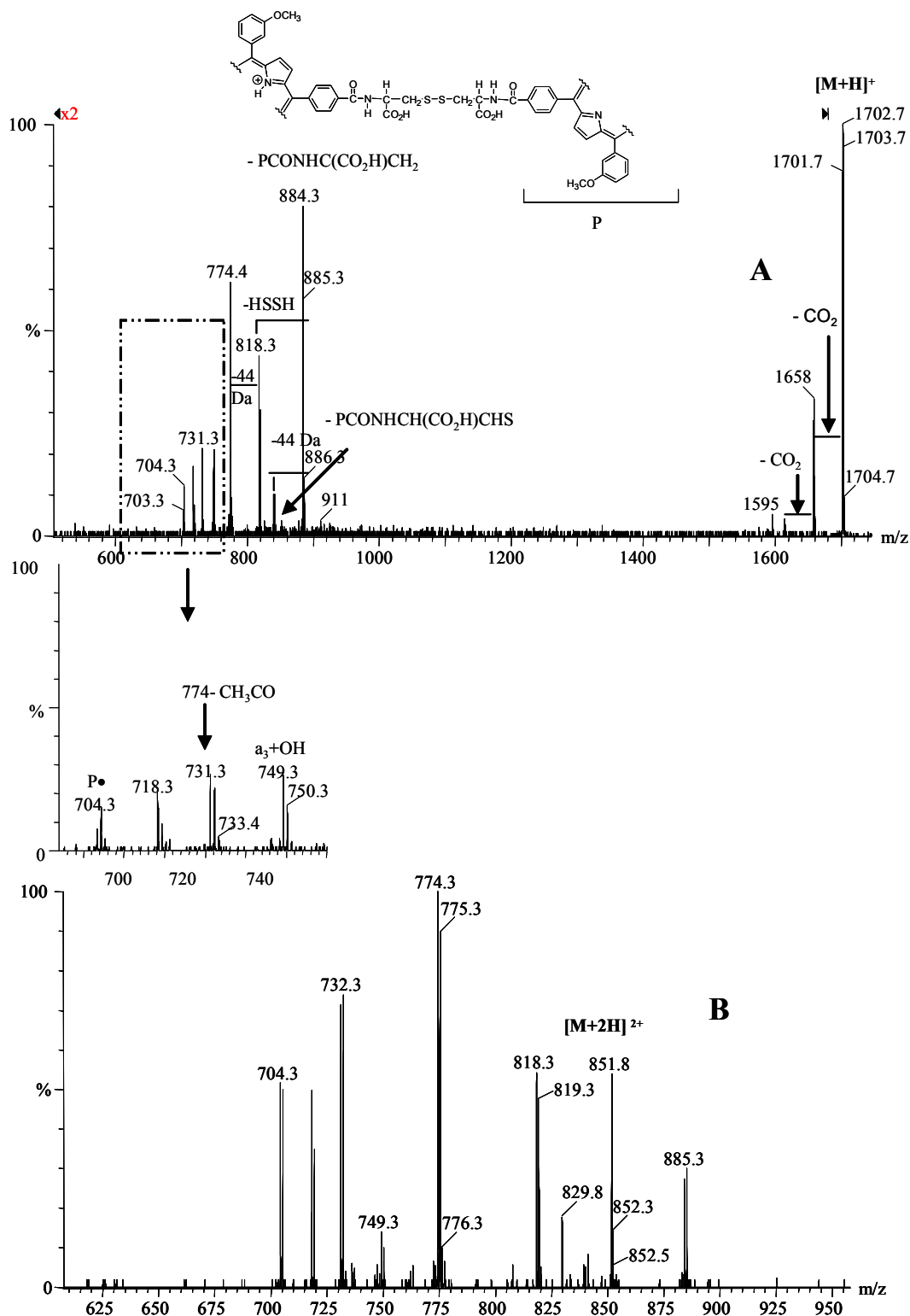


Figura 3.16– Espectros de ESI-MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  (A) e  $[M+2H]^{2+}$  (B) do composto 23.

Quanto ao espectro de MS/MS do ião de carga dupla  $[M+2H]^{2+}$  (Figura 3.16B) apresenta fragmentos com o mesmo  $m/z$  dos do espectro de MS/MS do ião mono-carregado  $[M+H]^+$  confirmando que a localização preferencial das cargas nos núcleos porfirínicos. Neste espectro também é observado um ião de menor abundância relativa a  $m/z$  829 (com duas cargas), atribuído à perda de  $CO_2$  a partir do ião precursor.

Tabela 3.2- Composição elementar dos fragmentos (calculada e observada).

<b>Formula esperada</b>	<b>Massa calculada(Da)</b>	<b>Massa observada (Da)</b>	<b>Erro (mDa)</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>DBE</b>
<b>Derivado 17</b>					
C <sub>49</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	791.2744	791.2616	-12.8	-16.2	34.0
C <sub>49</sub> H <sub>36</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	790.2666	790.2634	-3.2	-4.0	34.5
C <sub>49</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	763.3159	763.3041	-11.8	-15.4	32.0
C <sub>49</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	762.3080	762.3012	-6.8	-9.0	32.5
C <sub>49</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	760.2924	760.2970	4.6	6.1	33.5
C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	746.2767	746.2887	12.0	16.0	33.5
C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	730.2818	730.2813	-0.5	-0.7	33.5
C <sub>47</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	704.2787	704.2766	-2.1	-3.0	32.0
C <sub>45</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	693.2740	693.2869	12.9	18.6	31.0
C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	640.2349	640.2436	8.7	13.6	29.5
C <sub>40</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	613.2240	613.2197	-4.3	-7.0	28.5
<b>Derivado 18</b>					
C <sub>56</sub> H <sub>46</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	868.3486	868.3499	-1.3	-1.5	36.5
C <sub>55</sub> H <sub>42</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	852.3166	852.3159	-2.7	-3.2	37.5
C <sub>54</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	825.3315	825.3281	-3.4	-4.1	36.0
C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	762.2716	762.2776	6.0	7.8	33.5
C <sub>48</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	749.2764	749.2726	-3.8	-5.1	32.5
C <sub>48</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	748.2924	748.2889	3.5	4.7	32.5
C <sub>47</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	704.2787	704.2786	-0.1	-0.2	32.0
C <sub>46</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	690.2631	690.2662	3.1	4.5	32.0
<b>Derivado 19</b>					
C <sub>50</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	805.2900	805.2890	-1.0	-1.3	34.0
C <sub>50</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	804.2822	804.2923	10.1	12.5	34.5
C <sub>50</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	788.2873	788.2916	4.3	5.5	34.5
C <sub>49</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	777.2951	777.2961	1.0	1.3	33.0
C <sub>49</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	776.2873	776.2942	6.9	8.9	33.5
C <sub>49</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	760.2924	760.2943	1.9	2.5	33.5
C <sub>47</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	751.2795	751.2871	7.6	10.2	32.0
C <sub>48</sub> H <sub>34</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	744.2611	744.2604	-0.7	0.9	34.5

<b>Fórmula esperada</b>	<b>Massa calculada(Da)</b>	<b>Massa observada(Da)</b>	<b>Erro (mDa)</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>DBE</b>
C <sub>44</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	713.2638	713.2728	9.0	12.6	30.0
C <sub>47</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	704.2787	704.2785	-0.2	-0.3	32.0
C <sub>43</sub> H <sub>32</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	698.2403	698.2421	1.8	2.5	30.5
C <sub>46</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	688.2474	688.2498	2.4	3.4	33.0
C <sub>40</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	613.2240	613.2285	4.5	7.4	28.5
<b>Derivado 20</b>					
C <sub>51</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	834.2928	834.2941	1.3	1.6	34.5
C <sub>52</sub> H <sub>42</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	832.3135	832.3129	-0.6	-0.7	34.5
C <sub>51</sub> H <sub>42</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	820.3229	820.3135	9.4	11.4	33.5
C <sub>50</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	804.2901	804.2822	7.9	9.8	34.5
C <sub>50</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	790.3029	790.3094	6.5	8.2	33.5
C <sub>50</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	772.2924	772.2906	-1.8	-2.3	34.5
C <sub>49</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	760.2924	760.2922	-0.2	-0.2	33.5
C <sub>47</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	704.2766	704.2787	-2.1	-3.0	32.0
C <sub>46</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	688.2474	688.2585	11.1	16.1	33.0
C <sub>40</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	613.2240	613.2268	2.8	4.6	28.5
<b>Derivado 21</b>					
C <sub>53</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S	895.3040	895.3026	-1.4	-1.5	34.0
C <sub>53</sub> H <sub>44</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	846.3292	846.3254	-3.8	-4.4	34.5
C <sub>51</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	819.3057	819.3049	-0.8	-1.0	34.0
C <sub>52</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	814.3029	814.2961	-6.8	-8.4	35.5
C <sub>51</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	787.3159	787.3146	-1.3	-1.6	34.0
C <sub>51</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	786.3080	786.3062	-1.8	-2.3	34.5
C <sub>49</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	776.2873	776.2920	4.7	6.1	33.5
C <sub>48</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	733.2815	733.2882	6.7	9.2	32.5
C <sub>47</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	704.2787	704.2771	-1.6	-2.3	32.0

### 3.5- Conclusão

O acoplamento de aminoácidos e de ésteres de aminoácidos naturais à porfirina 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(3-metoxifenil)porfirina (**4**) conduziu à síntese de novos derivados de tipo porfirina-aminoácido com bons rendimentos, quando efectuado em DMSO e à temperatura ambiente, a partir do respectivo éster activado com *N*-hidroxisuccinimida. Todos os derivados foram sujeitos a purificação exceptuando o caso do derivado **23**, em que o acoplamento à cisteína conduziu ao aparecimento de uma mistura de compostos insolúveis. A análise dos espectros de ESI-MS/MS desta fracção, permitiu concluir que é constituída maioritariamente pelo derivado **23**.

A espectrometria de massa com ionização por Electrospray, revelou ser uma ferramenta valiosa na caracterização estrutural destes novos compostos. Verificou-se a formação de iões possíveis de ser atribuídos a fragmentações do núcleo porfirínico, ao longo da cadeia de aminoácido acoplado e também fragmentações características da cadeia lateral R<sup>1</sup> de cada aminoácido. No entanto, as vias de fragmentação observadas são bastante diferentes quando comparamos os espectros de MS/MS de derivados com um grupo carboxilo terminal e com um grupo éster terminal. Ao contrário do esperado, a fragmentação da ligação amida não é uma das fragmentações mais abundantes. De facto esta fragmentação, quando presente, ocorre com baixa abundância relativa, indicando que a localização preferencial da carga ocorre no macrociclo porfirínico e não no oxigénio do grupo carbonilo, o que poderá estar na origem da ausência ou baixa abundância relativa deste tipo de fragmentação.

### 3.6- Parte experimental

#### 3.6.1- Reagentes, solventes e equipamento experimental

Os reagentes comerciais utilizados não foram sujeitos a qualquer purificação prévia.

Os solventes usados nas diversas transformações e cristalizações eram analiticamente puros ou foram, quando necessário, sujeitos a purificação prévia:

- a piridina foi seca, por aquecimento a refluxo, sobre lentilhas de hidróxido de sódio e destilada em seguida;

- o sulfóxido de dimetilo foi seco, por aquecimento a refluxo, sobre hidreto de cálcio, e destilado em seguida.

Os solventes usados nas operações de purificação foram previamente destilados e passados por uma coluna de alumina neutra activada antes de serem utilizados.

As técnicas usadas para purificação, assim como os equipamentos usados na caracterização dos compostos sintetizados, encontram-se já descritas na secção 2.5.1.

Para aquisição dos espectros em electrospray, as amostras foram preparadas por diluição de 1  $\mu\text{L}$  de solução de concentração  $10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  de cada um dos derivados, previamente preparadas em clorofórmio, em 200  $\mu\text{L}$  de metanol. Os espectros de massa foram registados num aparelho Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK), usando azoto como gás nebulizador e árgon como gás de colisão.

As amostras foram introduzidas no espectrómetro de massa com um caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A voltagem da agulha e a do cone foram ajustadas a 3000 V e a 35 V, respectivamente. A temperatura da fonte de ionização usada foi de 80 °C. Os espectros de MS/MS foram adquiridos seleccionando o ião desejado no quadrupolo e ajustando a energia de colisão a 50-60 eV no caso dos iões de carga unitária  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e a 40-50 eV para os iões de carga dupla  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ . Os iões fragmento foram analisados num analisador TOF, usando uma resolução 9000 quer para a aquisição dos espectros de MS quer para a aquisição dos espectros de MS/MS. Na aquisição dos espectros de MS/MS, a resolução do quadrupolo  $\text{Q}_1$  foi ajustada a 0,7 Da.

### *3.6.2- Síntese de porfirinas acopladas a aminoácidos- procedimento geral*

Num balão de 25 mL, dissolveram-se 4 equivalentes de aminoácido em 2 mL de DMSO e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em excesso, adicionando-se de seguida 1 equivalente de éster activado **5**. A mistura reaccional foi mantida em agitação, à temperatura ambiente e protegida da luz e da humidade por um tubo de sílica gel durante 2h e 30min., findos os quais se observou,

por TLC, o consumo total da porfirina de partida. A reacção foi terminada após neutralização com uma solução aquosa de ácido cítrico seguida de lavagem com água destilada. A mistura reaccional foi extraída em clorofórmio, seca através de sulfato de sódio anidro e evaporada à secura com o auxílio de um evaporador rotativo. A purificação teve lugar recorrendo a cromatografia em coluna de sílica gel usando o solvente apropriado para cada caso e, quando necessário procedeu-se ao uso de TLC preparativa (ver secções seguintes). Após purificação, os novos derivados obtidos foram cristalizados usando uma mistura de diclorometano/éter de petróleo.

### 3.6.2.1- Acoplamento de glicinato de metilo

Esta reacção foi efectuada de acordo com o procedimento geral, envolvendo a adição de 19,8 mg (23,9  $\mu\text{mol}$ ) de éster activado **5** a uma solução em DMSO de glicinato de metilo (9,3 mg, 104  $\mu\text{mol}$ ) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (58,6 mg, 416  $\mu\text{mol}$ ). Depois de terminada a reacção de acordo com o procedimento experimental, a mistura obtida foi sujeita a cromatografia em coluna, usando diclorometano como eluente. Foram recolhidas duas fracções de cor rosa. A fracção menos polar e maioritária revelou ser constituída pelo derivado **19**. A fracção mais polar, constituída pela porfirina **4** e de quantidades não mensuráveis, foi desprezada.

Derivado **19**: **RMN de  $^1\text{H}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): -2,81 (s, 2H, NH), 3,90 (s, 3H, Gly-OCH<sub>3</sub>), 3,99 (s, 9H, 10,15,20-Ar-OCH<sub>3</sub>), 4,44 (d,  $J$ = 4,9 Hz, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 6,98 (t,  $J$ = 4,9 Hz, 1H, Gly-NH), 7,34 (dd,  $J$ = 8,0 e 2,0 Hz, 4H, 10,15,20-Ar-H-*p*), 7,64 (t,  $J$ = 8,0 Hz, 3H, 10,15,20-Ar-H-*m*), 7,78 -7,82 (m, 6H, 10,15,20-Ar-H-*o*), 8,20 (d,  $J$ = 8,1 Hz, 2H, 5-Ar-H-*m*), 8,31 (d,  $J$ = 8,1 Hz, 2H, 5-Ar-H-*o*), 8,77-8,91 (m, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos). **EM FAB<sup>+</sup>**:  $m/z$  819 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 704 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3$ ). p.f.: 270-272 °C. **Análise elementar**: Encontrado (%) C 73,20; H 5,07; N 8,52; Calculado para  $\text{C}_{51}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ : C 73,10; H 5,17; N 8,36.

### 3.6.2.2- Acoplamento de glicina

Esta reacção foi efectuada de acordo com o procedimento geral, envolvendo a adição de 20,2 mg (23,9  $\mu\text{mol}$ ) de éster activado **5** a uma solução de glicina (9,3 mg, 124  $\mu\text{mol}$ ) e

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60,2 mg, 430 μmol) em DMSO. Após terminar a reacção de acordo com o procedimento geral, os dois componentes da mistura reaccional foram separados por cromatografia em coluna. A primeira fracção, francamente minoritária, foi recolhida usando como eluente uma mistura de clorofórmio com 5% de metanol e identificada por TLC como sendo constituída pela porfirimonoácida **4**. O aumento da polaridade do eluente para diclorometano com 10% de metanol resultou na recolha de uma segunda fracção, maioritária, que foi identificada como sendo constituída pelo derivado **17**. Este derivado, após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo foi obtido com um rendimento de 85 %.

**Derivado 17: RMN de <sup>1</sup>H:** espectro não conclusivo devido, provavelmente, a efeitos de agregação

**EM FAB<sup>+</sup>:** *m/z* 806 ([M+H]<sup>+</sup>), 704 ([M+H]<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>).

### 3.6.2.3- Acoplamento de tirosina

O acoplamento de tirosina à porfirimonoácida **4** foi efectuado também de acordo com o procedimento geral e envolveu 20,0 mg (23,6 μmol) de éster activado **5**, 16,3 mg (91,1 μmol) de tirosina e 62,3 mg (445 μmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Neste caso, verificou-se por TLC a formação de dois produtos de cor rosa. Após terminar a reacção de acordo com o procedimento geral, as duas fracções foram separadas por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de clorofórmio com 5% de metanol. Após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo a fracção menos polar foi identificada como sendo formada pelo derivado **22** e a fracção mais polar como correspondendo ao derivado **18**. Estes compostos foram obtidos em quantidades muito semelhantes, apresentando rendimentos de 45% e 51% , respectivamente.

**Derivado 22: RMN de <sup>1</sup>H** (em CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): não conclusivo, provavelmente devido a efeitos de agregação. **EM FAB<sup>+</sup>:** *m/z* 1643 ([M+H]<sup>+</sup>), 704 ([M+H]<sup>+</sup>-C<sub>58</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>). p.f.>300 °C. **Análise elementar:** Encontrado (%) C 74,30; H 4,92; N 7,55; Calculado para C<sub>105</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>·3H<sub>2</sub>O: C 74,32; H 5,05; N7,43.



**Derivado 18: RMN de  $^1\text{H}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): -2,96 (s, 2H, Porf-NH), 3,07-3,18 (m, 2H, H-1'''), 3,92 (s, 6H, 10,20-Ar-H-OCH<sub>3</sub>), 3,95 (s, 3H, 15-Ar-OCH<sub>3</sub>), 4,55 (s largo, 1H, H-3''), 6,69 (d,  $J$ = 8,1 Hz, 2H, H-4''' e H-6'''), 7,18 (d,  $J$ = 8,1 Hz, 2H, H-3''' e H-7'''), 7,40 (dd,  $J$ = 11,8 e 9,1 Hz, 3H, 10,15,20-Ar-H-*p*), 7,63-7,67 (m, 9H, 10,15,20-Ar-H-*o* e 10,15,20-Ar-H-*m*), 8,20 (d,  $J$ = 7,8 Hz, 2H, H-3' e H-5'), 8,28 (d,  $J$ = 7,8 Hz, 2H, H-2' e H-6'), 8,37 (d,  $J$ = 5,6 Hz, 1H, H-2''), 8,83-8,87 (m, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos), 9,19 (s, 1H, Tir-OH). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 36,6 (C-1'''); 55,4 (10,15,20-Ar-OCH<sub>3</sub>); 56,4 (C-3''); 113,7 (10,15,20-Ar-C-*p*), 114,8 (C-4''' e C-6'''); 119,1; 119,8; 119,9; 120,3 (10,15,20-Ar-C-*o*); 125,7 (C-3' e C-5'); 127,2 (10,15,20-Ar-C-*o*); 127,9 (10,15,20-Ar-C-*m*); 128,9 (C-2'''); 129,7 (C-5'''); 130,3 (C-3''' e C-7'''); 131,4 (C- $\beta$ -pirrólicos); 134,2 (C-2', C-6'); 134,7 (C-5); 142,5; 143,8 (C-1'); 155,5; 157,7; 165,5 (C=O). **EM FAB<sup>+</sup>**:  $m/z$  912 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 704 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_4$ ). p.f.>300 °C. **Análise elementar**: Encontrado (%) C 70,76; H 4,91; N 6,88; Calculado para  $\text{C}_{57}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C 70,87; H 5,32; N 7,25.

#### 3.6.2.4- Acoplamento de serinato de metilo

Esta reacção foi de forma análoga às anteriores, efectuada de acordo com o procedimento geral, envolvendo 21,3 mg (25,3  $\mu\text{mol}$ ) de éster activado **5**, 59,8 mg (0,427 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 11,3 mg de serinato de metilo (96,5  $\mu\text{mol}$ ). Verificou-se por TLC a formação de dois compostos de cor rosa. Após terminar a reacção de acordo com o procedimento geral descrito anteriormente, a mistura reaccional foi purificada recorrendo a TLC preparativa, usando tolueno como eluente. A primeira fracção correspondente ao derivado **24** (produto minoritário) foi, após raspagem, recolhida e obtida com um rendimento de 6%. A segunda fracção, mais abundante, foi recolhida e obtida com um rendimento de 91% após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo. Esta fracção maioritária revelou ser constituída pelo derivado **20**.

**Fracção minoritária (derivado 24): EM FAB<sup>+</sup>**:  $m/z$  832 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 703 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$ ).

**Fracção maioritária (derivado 20): RMN de  $^1\text{H}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): -2,81 (s, 2H, Porf-NH), 2,58-2,62 (m, 1H, Ser-OH), 3,93 (s, 3H, Ser-OCH<sub>3</sub>), 3,98 (s, 9H, 10,15,20-Ar-OCH<sub>3</sub>), 4,22-4,25 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 5,07-5,10 (m, 1H, Ser-CH), 7,32-7,34 (m, 3H, 10,15,20-Ar-H-*p*), 7,44 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H, Ser-NH), 7,64 (m, 3H, 10,15,20-Ar-H-*m*), 7,78 (s, 3H, 10,15,20-Ar-H-*o*), 7,80 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3H, 10,15,20-Ar-H-*o*), 8,25 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H, 5-Ar-H-*m*), 8,32 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H, 5-Ar-H-*o*), 8,78, 8,89 e 8,91 (d, s, d,  $J = 4,9$  Hz, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos) **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 53,1 (Ser-OCH<sub>3</sub>); 55,4 (Ser-CH); 55,5 (10,15,20-Ar-OCH<sub>3</sub>); 63,8 (Ser-CH<sub>2</sub>); 113,6 (10,15,20-Ar-C-*p*); 118,4 (Porf-C-5); 120,1; 120,2; 120,4 (10,15,20-Ar-C-*o*); 125,6 (5-Ar-C-*m*); 127,5 e 127,6 (10,15,20-Ar-C-*m* e 10,15,20-Ar-C-*o*); 131,3 (C- $\beta$ -pirrólicos); 132,8; 134,7 (5-Ar-C-*o*); 143,3; 146,2 (C-1'); 147,3; 157,9; 167,7 (Porf-C=O). **EM FAB<sup>+</sup>**:  $m/z$  850 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 703 ( $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ). **Análise elementar**: Encontrado (%) C 72,18; H 5,06; N 8,14; Calculado para  $\text{C}_{52}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ : C 71,96; H 5,23; N 8,07; p.f.: 270-272 °C.

#### 3.6.2.5- Acoplamento de metioninato de metilo

O acoplamento de metioninato de metilo à porfirina **4** foi também efectuado de acordo com o procedimento geral, envolvendo a reacção de 21,9 mg (25,9  $\mu\text{mol}$ ) de éster activado **5**, 64,5 mg (0,430 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 14,5 mg (0,90  $\mu\text{mol}$ ) de metioninato de metilo. A reacção foi terminada de acordo com o procedimento geral. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano/éter de petróleo (2:1). Após cristalização numa mistura de diclorometano/éter de petróleo, o derivado **21** foi obtido com um rendimento de 90 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  (em  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): -2,82 (s, 2H, Porf-NH), 2,38-2,54, 2,84- 2,92, 2,95-3,01 e 3,03-3,13 ppm (m, 4H, H-1''' e H-2'''), 2,66 (s, 3H, H-4'''), 3,91 (s, 3H, H-6''), 3,99 (s, 3H, 10,15,20-Ar-OCH<sub>3</sub>), 5,07-5,09 (m, 1H, H-3''), 7,34 (dd,  $J = 8,0$  e 2,1 Hz, 3H, 10,15,20-Ar-H-*p*), 7,65 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, 10,15,20-Ar-H-*m*), 7,78-7,82 (m, 6H, 10,15,20 H-*o*) 7,88 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H, H-2''), 8,26-8,33 (m, 4H, H-2', H3', H5', H-6'), 8,78-8,91 (m, 8H, H- $\beta$ -pirrólicos). **EM FAB<sup>+</sup>**:  $m/z$  910 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 703 ( $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ ). p.f.: >300 °C.

### 3.6.2.6- Acoplamento de cisteína.

A reacção de acoplamento do cisteína à porfirina **4**, de acordo com o procedimento geral, conduziu à síntese de um derivado insolúvel, de difícil manuseamento e, consequentemente, purificação e caracterização. A reacção foi efectuada de forma análoga às anteriores com a participação de 19,7 mg de éster activado **5**, 57,3 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 13,7 mg de aminoácido. Após terminada a reacção, mediante neutralização com uma solução aquosa de ácido cítrico e lavagem com água destilada, a extracção da mistura reaccional foi bastante difícil, mesmo quando se usaram misturas de diclorometano/metanol (50%). Após evaporar o solvente, o resíduo obtido apresentou-se insolúvel. Desta forma, não foi possível efectuar a caracterização por RMN e por UV-VIS. A caracterização por espectrometria de massa em electrospray (secção 3.4) permitiu concluir que a mistura reaccional é constituída por mais do que um produto, apresentando o derivado **23** como componente maioritário.

## 3.7- Referências

1. Perrée-Fauvel, M, Verchère-Béaur, C, Tarnaud, E, Anneheim-Herbelin, G, Bône, N, Gaudemer, A, *Tetrahedron* **1996**, 52: 13569.
2. Verchère-Béaur, C, Perrée-Fauvel, M, Tarnaud, E, Anneheim-Herbelin, G, Bône, N, Gaudemer, A, *Tetrahedron*, **1996**; 52: 13589.
3. Soukos, NS, Hamblin, R, Hasan, T, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, 65: 773.
4. Tomé, JPC, Neves, MGPM, Tomé, AC, Cavaleiro, JAS, Soncin, M, Magaraggia, M, Ferro, S, Jori, G. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47: 6649.
- 5- Gaskell, SJ, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32: 677.
6. Domingues, MRM, Nemirovskiy, OV, Marques, MGOS, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, Ferrer-Correia, AJ, Gross, ML, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9: 767.
7. Danton, M, Lim, CK, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18: 2309.
8. Domingues, MRM, Marques, MGOS, Ferrer-Correia, AJ, Tomé, AC, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, *J. Porphyrins Phthalocyanines.*, **1999**, 3: 172.

9. Domingues, MRM, Marques, MGOS, Vale, CAM, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, Ferrer-Correia, AJ, Nemirovskiy, OV, Gross, ML, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10: 217.
10. Domingues, MRM, Marques, MGOS, Domingues, P, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, Ferrer-Correia, AJ, Nemirovskiy, OV, Gross, ML, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12: 381.
11. Silva, EMP, Domingues, MRM, Barros, C, Faustino, MAF, Tomé, JPC, Neves, MGPMS, Tomé, AC, Santana-Marques, MG, Cavaleiro, JAS, Ferrer-Correia, AJ, *J. Mass Spectrom.*, **2005**, 40: 117.
12. Domingues, MRM, Domingues, P, Reis, A, Correia, AJ, Tomé, JPC, Tomé, AC, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39: 158.
13. Rubino, FM, Mascaro, P, Banfi, S, Quici, S, *Org. Mass Spectrom.*, **1991**, 26: 161.
14. Quirke, JME. “Mass Spectrometry of Porphyrins and Metalloporphyrins” em “The Porphyrin Handbook, Theoretical and Physical Characterization”. Vol. 7, editado por Kadish KM, Smith KM, Guillard R, Academic Press: San Diego. 2000; 371.
15. “Interpretation of Mass Spectra”, editado por McLafferty, FW, Turecek, F,. University Science Books: Mill Valley, CA. 1993; 265.
16. Barker, J em “Mass Spectrometry”, editado por Ando DJ, John Wiley and Sons, Chichester. 1999; 228.
17. “Interpretation of Mass Spectra”, editado por McLafferty, FW, Turecek, F, University Science Books: Mill Valley, CA. **1993**; 275.
18. Roepstorff, P, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1984**, 11: 601.
19. Papayannopoulos, IA, *Mass Spectrom. Rev.*, **1995**, 14: 49.
20. Schlosser, A, Lehmann, WD, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35: 1382.
21. Tang, X, Ens, W, Standing, KG, Westmore, JB, *Anal. Chem.*, **1988**, 60: 1791.
22. Sharp, JS, Tomer, KB, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16: 607.
23. Reid, GE, Roberts, KD, Kapp, EA, Simpson, RS, *J. Proteom. Res.*, **2004**, 3: 751.
24. Domingues, MRM, Santana-Marques, MG, Domingues, P, Faustino, MA, Neves, MGPMS, Cavaleiro, JAS, Ferrer-Correia, AJ, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14: 2025.
25. Rubino, FM, Verduci, CV, Giampiccolo, R, Pulvirenti, S, Brambilla, G, Colombi, A, *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39: 1408.

26. Adachi, J, Yoshioka, N, Funae, R, Nushida, H, Asano, M, Ueno, Y. *J. Chromatog. B.*, **2004**, *806*: 41.

## Abreviaturas

$\delta$ - desvio químico em ppm

$\epsilon$ - absorvidade molar

$\lambda$ - comprimento de onda (nm)

$\lambda$  máx- comprimento de onda para os máximos de absorvência

ALA- ácido 5-aminolevulínico

COSY- correlação espectroscópica homonuclear bidimensional, em RMN

AR- abundância relativa

d- duplete

dd- duplo duplete

dt- duplo tripleto

DMF- *N,N'*-dimetilformamida

DMRI- degeneração macular da retina relacionada com a idade

DMSO- sulfóxido de dimetilo

EM- espectrometria de massa

FAB- ionização por bombardeamento com átomos rápidos

FD- Fotodiagnóstico

HpD- derivado da Hematoporfirina

HMBC- correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional, em RMN

HSQC- correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, em RMN

IUPAC- União Internacional de Química Pura e Aplicada

*J*- constante de acoplamento

LDL- lipoproteínas de baixa densidade

m- multiplete

$M^{+\bullet}$  ião molecular

$[M+H]^+$  ião molecular protonado

*m/z*- razão massa/carga

MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS- tampão fosfato salino

PDT- Terapia fotodinâmica

ppm- parte por milhão

Py- piridina

R<sub>f</sub>- factor de retenção (retardamento)

RMN de <sup>1</sup>H- ressonância magnética nuclear de próton

RMN de <sup>13</sup>C- ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de <sup>19</sup>F- ressonância magnética nuclear de flúor 19

s- singuleto

SDS- dodecilsulfato de sódio

t- tripleto

TFA- ácido trifluoroacético

THF- tetra-hidrofurano

TLC- cromatografia em camada fina

TMS- tetrametilsilano

UV-Vis- espectroscopia de ultravioleta-visível